

Université de Sherbrooke

Étude du rôle des isoenzymes de la PKC dans l'adhésion des
lymphocytes T aux cellules endothéliales

par
Serge Gravel
Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M. Sc)

Novembre 1996



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-21760-4

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	i
LISTE DES TABLEAUX	iv
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vi
RÉSUMÉ	
 1. INTRODUCTION	 1
1.1 Rôles de l'adhésion cellulaire	1
1.2 Les molécules d'adhésion	2
1.2.1 Les cadhérines	2
1.2.2 Les sélectines	4
1.2.3 Les molécules d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines	4
1.2.4 La famille des intégrines	6
1.2.4.1 Les intégrines et la transmission de signaux intracellulaires ..	7
1.2.5 Les protéoglycans de surface	8
1.3 Suite des événements menant à l'adhésion et l'extravasation	9
1.3.1 Le "rolling"	11
1.3.2 Activation et adhésion ferme	11
1.3.3 La migration transendothéliale	12
1.4 Régulation de l'expression des molécules d'adhésion	12
1.5 La protéine kinase C	14
1.5.1 Les isoformes de la PKC	14
1.5.2 Le pseudosubstrat et l'activation de la PKC	19
1.5.3 Déterminants de la spécificité des différents isoformes	19
1.6 Utilisation d'ARN antisens pour diminuer l'expression d'un gène	20
1.7 But du travail	21
 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	 23
2.1 Matériel	23
2.2 Méthodes	24
2.2.1 Culture cellulaire	24
2.2.2 Construction des plasmides	24

2.2.2.1	Construction de pcDNA3/PKC α et de pcDNA3/CKP α	24
2.2.2.2	Construction de pcDNA3/PKC ε et de pcDNA3/CKP ε	25
2.2.2.3	Construction de pcDNA3/PKC ζ et de pcDNA3/CKP ζ	25
2.2.3	Transfection des constructions plasmidiques	26
2.2.4	Techniques utilisées pour la mise en évidence des différents isoformes de la PKC exprimés chez les cellules ECV 304 et la mesure des niveaux de PKC dans les cellules transfectées avec les vecteurs pcDNA3/PKC α et pcDNA3/CKP α	27
2.2.4.1	Extraction des protéines	27
2.2.4.2	Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose	28
2.2.4.3	Détection des isoformes de la PKC	28
2.2.4.4	Quantification des immunoblots	29
2.2.5	Étude de cytofluorimétrie	30
2.2.6	Mise en évidence des filaments d'actine par fluorescence	30
3.	RÉSULTATS	32
3.1	Isoformes de la PKC exprimés par la lignée cellulaire ECV 304	32
3.2	Transfection stable des plasmides pour la surexpression et la diminution d'expression des isoformes α , ε et ζ de la PKC dans les cellules ECV 304	32
3.3	Mesure des niveaux de PKC α dans les transfectants ECV/PKC α et ECV/CKP α	35
3.4	Évaluation de la reproductibilité des immunoblots	39
3.5	Analyse de l'organisation des filaments d'actine chez les transfectants ECV/PKC α et ECV/CKP α	39
3.6	Expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 chez les transfectants ECV/PKC α et ECV/CKP α	46
4.	DISCUSSION	48
4.1	La technique antisens comme moyen d'étude du rôle des isoformes de la PKC	48
4.2	Isoformes de la PKC exprimés par la lignée de cellules endothéliales humaines ECV 304	48

4.3	Validité de la méthode de quantification par Western.....	49
4.4	Niveaux d'expression de la PKC α dans les transfectants	50
4.5	Expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 chez les transfectants ECV/PKC α et ECV/CKP α	51
4.6	Étude de la morphologie des microfilaments chez les cellules ECV 304	52
REMERCIEMENTS		54
RÉFÉRENCES		55

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1: Caractéristiques de différents isoformes de la PKC	17
Tableau 2: Quantification de l'isoforme α de la PKC dans les transfectants ECV/CKP α et ECV/PKC α	38
Tableau 3: Expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 chez les transfectants ECV/PKC α et ECV/CKP α	47

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Étapes menant à l'extravasation des leucocytes	10
Figure 2:	Structure des différents isoformes de la PKC	15
Figure 3:	Isoformes de PKC exprimés par la lignée de cellules endothéliales ECV 304	33
Figure 4:	Représentation schématique du vecteur d'expression eucaryote pcDNA3	34
Figure 5:	Analyse Western des transfectants ECV/PKC α et ECV/CKP α	37
Figure 6:	Évaluation du pouvoir quantitatif des immunoblots	40
Figure 7:	Visualisation des filaments d'actine chez les cellules ECV 304	41-45

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire
AGL: acide gras libre
BSA: albumine bovine sérique
Ca²⁺: calcium
CaCl₂: chlorure de calcium
CMH: complexe majeur d'histocompatibilité
CPM: coups par minute
CSF-1R: récepteur du "colony stimulating factor 1"
DAG: 1,2-sn-diacylglycérol
DEPC: diéthylpyrocarbonate
DTT: dithiothréitol
EDTA: "ethylene glycol-bis (b-aminoethylether) N, N, N', N'-tetraacetic acid
EGTA: "ethylenediamine tetraacetic acid"
FAK: "focal adhesion kinase"
FITC: fluorescéine isothiocyanate
HCAM: "homing-associated cell adhesion molecule"
ICAM: "intercellular adhesion molecule"
IP3: D-myo-inositol 1,4,5-triphosphate
Kb: kilobase
KCl: chlorure de potassium
KH₂PO₄: potassium phosphate monobasique
LFA: "lymphocyte function-associated antigen"
LPS: lipopolysaccharide
LysoPC: lysophosphatidylcholine
MAP: "mitogen activated protein"
Mg²⁺: magnésium
MOPS: acide 3-(N-morpholino)propane-sulfonique
Na₂HPO₄: sodium phosphate
NaCl: chlorure de sodium
NaOH: hydroxyde de sodium
NCAM: "neural cell adhesion molecule"
NMAF: "nuclear membrane activation factor"
p: poids
PAGE: "polyacrylamide gel electrophoresis"

pb: paire de base
PBS: tampon phosphate salin
PDGFR: récepteur du "platelet-derived growth factor"
PECAM: "platelet-endothelial adhesion molecule"
PI-3K: phosphatidyl inositol 3-kinase
PIP-5K: phosphatidyl inositol phosphate 5-kinase
PIP₂: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP₃: phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PKC: protéine kinase C
PKCa: protéine kinase C atypique
PKCc: protéine kinase C conventionnelle
PKCn: protéine kinase C nouvelle
PLC: phospholipase C
PMA: phorbol 12-myristyl 13-acétate
PMSF: fluorure de phénylméthylsulfonyl
PS: phosphatidylsérine
SDS: sodium dodécyl sulfate
ser: sérine
SH: homologie src
SSC: saline-sodium-citrate
STE: sodium-tris-EDTA
TCR: récepteur du lymphocyte T
thr: thréonine
TNF: facteur de nécrose des tumeurs
Tris: "Tris [hydroxyméthyl] amino methane"
V: volume
VCAM: "vascular cellular adhesion molecule"
VLA: "very late antigen"

RÉSUMÉ

La PKC constitue une famille d'isoenzymes, possédant une activité Ser/Thr kinase, dont douze isoformes ont été décrits jusqu'à présent. Il est maintenant clairement établi dans la littérature que les isoformes de la PKC possèdent des fonctions biologiques différentes. Cependant, dû à l'absence d'inhibiteurs spécifiques pour ces isoformes, il a été difficile jusqu'à tout récemment de déterminer leurs rôles particuliers. L'utilisation de la technologie antisens a apporté une approche nouvelle à ce problème. Cette technique repose sur le fait que l'expression d'une protéine peut être inhibée par l'hybridation d'une séquence nucléotidique complémentaire à l'ARNm encodant la protéine. Nous avons utilisé cette technique, ainsi que des essais de surexpression afin d'étudier le rôle de la PKC α dans deux aspects importants du processus permettant de cibler les leucocytes au site d'infection ou de lésion: 1) l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 par les cellules endothéliales 2) la réorganisation des filaments d'actines chez les cellules endothéliales.

Pour ce faire, nous avons sous cloné l'ADNc complet de la PKC α dans les orientations sens (pour la surexpression) et antisens (pour diminuer l'expression) dans un vecteur d'expression eucaryote et transfecté ces constructions dans la lignée de cellules endothéliales humaines ECV 304. Des lignées stables ont été générées par une sélection au G418. L'analyse Western des transfectants a montré une diminution d'expression de la PKC α de 70 +/- 25 % dans la lignée de cellules transfectées avec la construction antisens et une surexpression de 36 +/- 25% dans les cellules transfectées avec la construction sens. Cependant, il est impossible de conclure que les variations de niveaux d'expression observées sont dues à l'expression des constructions puisque la procédure expérimentale n'a pas été faite de façon assez rigoureuse. D'autre part, il est impossible d'associer les phénotypes étudiés (expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 et l'état des fibres de stress) à l'expression de la PKC α puisque les modifications observées pourraient très bien être dues à des modifications aléatoires entre les différentes populations et non à des différences d'expression de la PKC α .

1. INTRODUCTION

1.1 Rôles de l'adhésion cellulaire

Les phénomènes d'adhésion intercellulaire jouent un rôle majeur dans la régulation de plusieurs processus incluant le développement embryonnaire, la croissance des tumeurs et la formation de métastases, la mort cellulaire programmée, le «homing» et l'activation des leucocytes, la résorption des os et la réponse cellulaire au stress mécanique (Miyasaka, 1995; Edelman, 1992; Grunwald, 1993; Jutila, 1994; Shattil et coll., 1994). L'adhésion cellulaire est médiée par différentes paires de ligands-récepteurs appelés molécules d'adhésion. Les molécules d'adhésion sont classées en cinq grandes familles soient les cadhérines, les sélectines, les membres de la superfamille des immunoglobulines, les intégrines et les protéoglycans de surface (Uchiyama et Anderson, 1994).

En ce qui a trait au système immunitaire, l'adhésion des lymphocytes circulants à l'endothélium vasculaire constitue une étape importante dans le développement des réponses immunes et inflammatoires. Le phénomène d'adhésion permet de cibler au site d'inflammation ou d'infection les lymphocytes. Ceux-ci migreront par la suite à travers l'endothélium pour se retrouver au site d'infection ou de lésion. Cette étape est connue sous le nom d'extravasation, ou diapédèse. L'adhésion entre les lymphocytes T et les cellules endothéliales est principalement médiée par des sélectines, des membres de la superfamille des immunoglobulines et des intégrines.

1.2 Les molécules d'adhésion

Cette section décrit certaines des propriétés des différentes familles de molécules d'adhésion, en mettant l'accent sur celles impliquées dans l'interaction entre les lymphocytes T et l'endothélium, lorsque applicable.

1.2.1 Les cadhérines

Les cadhérines constituent une famille de molécules d'adhésion dépendantes du Ca^{2+} . Elles médient des interactions homophiles (un type particulier de cadhérine lie préférentiellement le même type) cellules-cellules dans un grand nombre de tissus. Les cadhérines classiques N, E et P, identifiées il y a une dizaine d'années, ainsi que les cadhérines R, B et EP identifiées plus récemment, possèdent une structure commune incluant un site médiant l'adhésion, un site de liaison du calcium, un domaine d'intégration à la membrane, un site d'interaction au cytosquelette, un site de liaison aux caténines et des sites de glycosylation, de phosphorylation et de protéolyse. Les cadhérines possèdent des patrons d'expression spatio-temporels particuliers lors du développement embryonnaire et jouent un rôle critique dans la morphogénèse. Ceci a été démontré par la perturbation de l'expression de plusieurs cadhérines dans des systèmes en développement (Kintner, 1992; Boller et coll., 1985).

Les techniques de génétique moléculaire utilisées plus récemment ont permis d'identifier plusieurs autres cadhérines chez les vertébrés et les invertébrés et ces protéines sont maintenant incluses dans la superfamille des cadhérines sur

la base de leur homologie de structure. Certaines d'entre elles, telles que les cadhérines de type M et T présentent d'importantes homologies avec les cadhérines classiques, à l'exception de domaines modifiés ou délétés. D'autres, telles que la protéine FAT de *Drosophila* et les cadhérines desmosomales, possèdent des structures très différentes laissant supposer que leurs fonctions le sont également.

Le domaine intracellulaire des cadhérines est la région la plus conservée de cette famille de molécules, suggérant que ce domaine possède des fonctions importantes. L'importance de ce domaine a clairement été démontrée par l'expression de mutants de délétion de cette région. Les cadhérines E et N possédant cette délétion sont incapables de médier l'adhésion et ce, même si le domaine extracellulaire reste intact (Nagafuchi et Takeichi, 1988; Fujimori et coll., 1990). Les résultats ont montré que ces mutants n'avaient plus la capacité de lier le cytosquelette, suggérant que cette association est essentielle à la liaison intercellulaire. L'importance de la liaison au cytosquelette est mal comprise. L'hypothèse la plus probable est que l'interaction individuelle entre les cadhérines est trop faible pour médier l'adhésion. Si tel est le cas, elles doivent s'agréger latéralement aux points de contact cellule-cellule pour augmenter l'efficacité de l'adhésion. Le cytosquelette servirait de support facilitant les interactions latérales (Takeichi, 1991).

Au niveau de l'ultrastructure, les cadhérines sont concentrées au niveau des jonctions de la *zonula adherens*. Des études utilisant des jonctions *adherens* isolées ont montré que trois membres de la famille des protooncogènes src soit src, yes et lyn se concentrent à ces jonctions suggérant que la *zonula adherens* fournit un centre d'actions pour ces kinases (Takeichi, 1991). Ces tyrosines

kinases pourraient réguler la fonction du complexe cadhérine-cytosquelette ou médier la transmission de signaux intracellulaires.

1.2.2 Les sélectines

La famille des sélectines comprend trois membres désignés E (endothélial), P (plaquette) et L (leucocyte) sélectine. Les sélectines de type E et P sont exprimées par les cellules endothéliales alors que le type L n'est exprimé uniquement que par les leucocytes (Carlos et Harlan, 1994). L'analyse de la séquence de ces trois molécules prédit une protéine transmembranaire de type 1 possédant un domaine s'apparentant au domaine de liaison des lectines Ca^{2+} -dépendantes, une région d'homologie au facteur de croissance épidermique (EGF) et un nombre variable de modules d'une soixantaine d'acides aminés similaires à ceux retrouvés dans certaines protéines liant le complément (Bevilacqua, 1993). La sélectine L, présente à la surface des lymphocytes T, a comme ligand l'antigène de Lewis présent à la surface des cellules endothéliales (Foxall et coll., 1992; Green et coll., 1992). Le lymphocyte T ne possède pas de récepteur pour les sélectines de type E et P.

1.2.3 Les molécules d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines

Les molécules de cette famille sont caractérisées par la présence de nombreux domaines immunoglobulines ("like"), consistant en deux feuillets plissés β antiparallèles de 90 à 100 acides aminés reliés par un pont disulfure. Des molécules impliquées dans des fonctions immunitaires (CMH, CD4, CD8 et le TCR), dans le développement neuronal (NCAM) et la transmission du signal (CSF-1R, PDGFR) font partie de cette famille. En ce qui a trait à l'interaction

entre les lymphocytes et l'endothélium, les cellules endothéliales expriment trois molécules d'adhésion de cette famille possédant des ligands chez le lymphocyte T soit VCAM-1, ICAM-1 et ICAM-2.

VCAM-1 a initialement été caractérisé chez les cellules endothéliales vasculaires suite à l'action de médiateurs de l'inflammation (Osborn et coll., 1989; Rice et Bevilacqua, 1989). On a montré que cette molécule d'adhésion joue un rôle dans le recrutement et l'extravasation des leucocytes lors des réactions immunes et inflammatoires (Sligh et coll., 1993; Rice et Bevilacqua, 1989). Les lymphocytes T expriment à leur surface l'intégrine VLA-4 qui est le contre-récepteur de VCAM-1.

Les molécules d'adhésion ICAM-1 et ICAM-2 présentes chez les cellules endothéliales possèdent le même récepteur, l'intégrine LFA-1. L'expression de ICAM-1 est modulée par les cytokines. Ceci est démontré par sa régulation à la hausse par l'interleukine-1 (IL-1), le facteur de nécrose de tumeur (TNF) et l'interféron gamma (Rothlein et coll., 1988). Par contre, des analyses Northern ont montré que l'expression de ICAM-2 n'est pas modulée par les cytokines. Le haut niveau d'expression constitutif de ICAM-2 contraste avec la faible mais inductible expression de ICAM-1 ce qui suggère d'importantes différences dans leurs rôles respectifs. ICAM-2 est le ligand prédominant de LFA-1 sur l'endothélium non activé et par conséquent est possiblement important dans la recirculation normale des lymphocytes et le recrutement des cellules T mémoires (de Fougerolles et coll., 1991). De par sa nature inductible par les cytokines, ICAM-1 exerce possiblement son rôle lors de réactions inflammatoires et immunitaires.

1.2.4 La famille des intégrines

Les intégrines sont des protéines de surface qui médient principalement l'attachement à la matrice extracellulaire. Certaines classes d'intégrines sont également impliquées dans l'adhésion intercellulaire. Les intégrines forment une famille de protéines composée de plusieurs membres résultant de la combinaison de seize sous-unités α pouvant s'associer de façon non covalente avec huit sous-unités β différentes pour former un hétérodimère (Hynes, 1992). Elles sont classées selon la chaîne β qu'elles possèdent en intégrines VLA ($\beta 1$), intégrines leucocytaires ($\beta 2$) et intégrines cytoadhésines ($\beta 3$). Les intégrines possédant les chaînes $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 7$ (βp) et $\beta 8$ ne possèdent pas de noms particuliers.

Les chaînes α des intégrines possèdent environ sept répétitions en tandem d'une soixantaine d'acides aminés possédant une homologie au motif de liaison du calcium «EF-hand». Trois ou quatre de ces répétitions sont possiblement utilisées pour lier un cation divalent soit le Mg^{2+} ou le Ca^{2+} selon les intégrines (Hogg, 1991). Les chaînes β possèdent également des caractéristiques communes. Des répétitions en tandem de quatre régions riches en résidus cystéine possiblement essentiels au maintien de la structure tertiaire sont conservées chez toutes les chaînes β . De plus, une centaine d'acides aminés conservés en N-terminal sont importants pour la formation de l'hétérodimère α/β (Arnaout, 1990).

Tel que mentionné dans la section précédente, deux molécules de cette famille, présentes chez le lymphocyte T, sont impliquées dans l'adhésion à

l'endothélium: l'intégrine LFA-1 (α L β 2) contre-récepteur de ICAM-1 et ICAM-2, et VLA-4 (α 4 β 1) contre-récepteur de VCAM-1.

1.2.4.1 Les intégrines et la transmission de signaux intracellulaires

En plus du rôle qu'elles jouent dans l'adhésion, les intégrines sont également impliquées dans la transmission de signaux intracellulaires. Les études récentes sur la signalisation médiée par les intégrines montrent que celles-ci sont impliquées dans plusieurs voies identifiées auparavant pour les facteurs de croissance et les cytokines. Les intégrines peuvent induire des influx calciques, des échanges de H^+ , la phosphorylation sur résidus tyrosine, des altérations dans le métabolisme des phosphoinositides, l'activation de MAP kinases, la régulation de l'expression des gènes et une stimulation de la croissance (Hynes, 1992; Yamada et Miyamoto, 1995).

Les courts domaines cytoplasmiques des sous-unités α et β des intégrines ne possèdent pas d'activité enzymatique intrinsèque mais se lient à des protéines cytoplasmiques, lesquelles s'associent pour former un large complexe contenant des protéines du cytosquelette et des protéines de signalisation (Clark et Brugge, 1995). La protéine tyrosine kinase FAK qui s'associe au domaine cytoplasmique de la sous-unité β 1 des intégrines (Schaller et Parsons, 1994) semble jouer un rôle central dans la transmission de signaux médiée par les intégrines. Cette kinase s'autophosphoryle sur un résidu tyrosine (Y^{397}) et son activité tyrosine kinase augmente suite à l'engagement des intégrines (Schaller et Parsons, 1994). La tyrosine 397 est située dans une séquence consensus de liaison de protéines contenant un domaine SH2. Le modèle d'action de la FAK propose que celle-ci s'associe avec la sous-unité β 1 des

intégrines, s'autophosphoryle sur le résidu tyrosine 397 et recrute des protéines contenant des domaines SH2 tel que pp60^{src} (Schaller et coll., 1994), Csk et PI3K (Chen et Guan, 1994). D'autre part, la phosphorylation de la paxiline par la FAK peut possiblement permettre de recruter d'autres protéines contenant des domaines SH2 (Fuortes et coll., 1994). La suite des événements de transmission du signal reste à déterminer. Cependant, on sait que Crk lie la paxiline lorsque celle-ci est phosphorylée sur résidu tyrosine (Birge et coll., 1993) et que C3G (une protéine qui facilite la relâche du GDP par ras et permet son activation) lie Csk via son domaine SH3. Le recrutement de Csk et C3G par la paxiline pourrait donc permettre l'activation de ras et subséquemment l'activation de la voie des MAP-kinases (Richardson et Parsons., 1995). La PLC γ est également un substrat potentiel du complexe paxiline-PTK. L'identité de la kinase responsable de la phosphorylation de la PLC γ n'est cependant pas connue. L'activation de cette dernière pourrait amener une stimulation de la PKC via la production de DAG et de Ca²⁺ (Richardson et Parsons., 1995).

1.2.5 Les protéoglycans de surface

Les protéoglycans constituent une famille de protéines ayant comme caractéristique commune la présence d'une ou plusieurs chaînes glycosaminoglycan attachées à leur structure protéique. La chaîne glycosaminoglycan, liée de façon covalente à la structure protéique, peut être la chondroïtine sulfate, le dermatan sulfate, le kératan sulfate, l'héparan sulfate ou l'héparine (Hardingham et Fosang, 1992). Les protéoglycans de surface les mieux décrits dans les phénomènes d'adhésions sont les syndécans et le CD44.

Les membres de la famille des syndécans sont caractérisés par la présence de domaines cytoplasmiques et transmembranaires conservés et de domaines extracellulaires dissimilaires. La chaîne glycosaminoglycan attachée à leur structure protéique est soit l'héparan sulfate et/ou la chondroïtine sulfate. Le type, la taille et le nombre de chaînes glycosaminoglycan diffèrent suivant le type cellulaire. Les syndécans sont connus, entre autre, comme médiateurs de l'adhésion des cellules épithéliales à la fibronectine et au collagène interstitiel (Uchiyama et Anderson, 1994).

CD44 (HCAM) est caractérisé par la présence d'une courte queue cytoplasmique, d'un domaine transmembranaire et d'un ectodomaine de 25 à 39 kD qui contient le ou les sites d'attachement des glycosaminoglycans chondroïtine sulfate et/ou héparan sulfate. CD44 est présent à la surface des lymphocytes et joue un rôle important dans le «homing» de ces cellules aux tissus lymphoïdes (Stamenkovic et coll., 1991).

1.3 Suite des événements menant à l'adhésion et l'extravasation

Les mécanismes impliqués dans le ciblage des lymphocytes T au sites d'infection ou d'inflammation ne sont pas très bien connus. Par contre, des résultats récents suggèrent que ceux-ci sont très semblables à ceux utilisés par les monocytes et les neutrophiles (Springer, 1994; Alon et coll., 1995; Nakajima et coll., 1994). Les différentes étapes menant à l'extravasation des leucocytes sont montrées à la figure 1 et discutées ci-après.

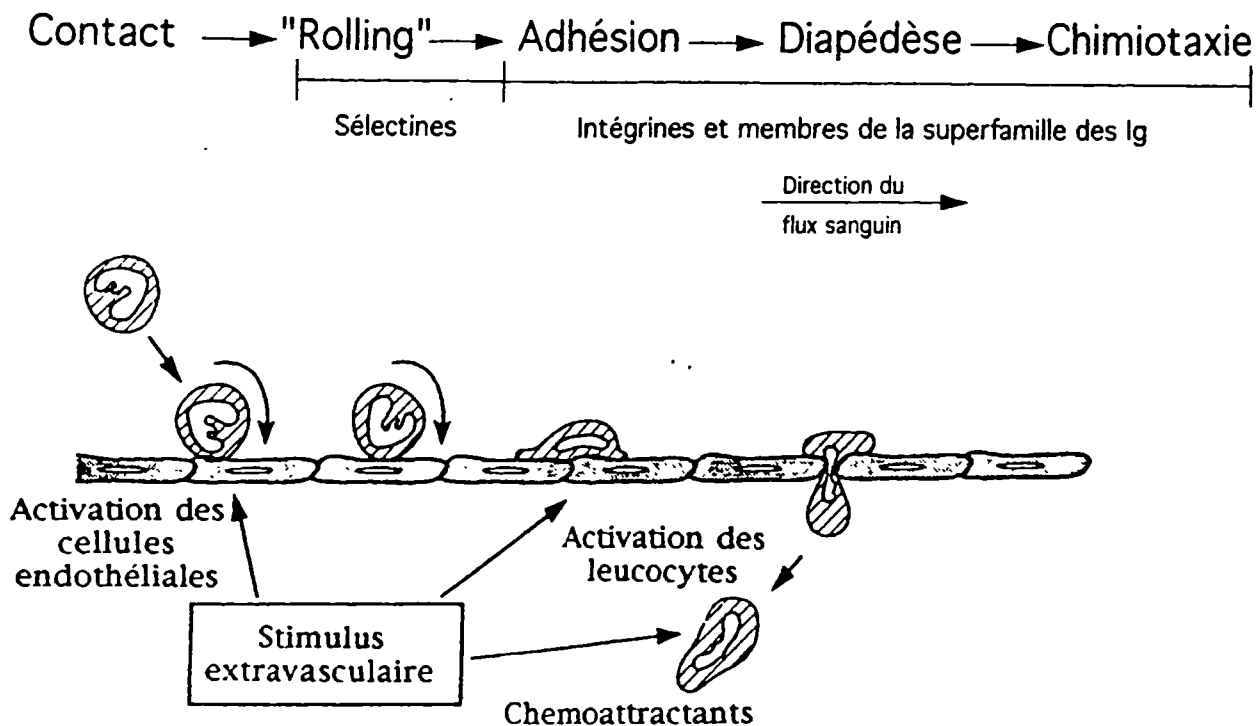


Figure 1.  tapes menant à l'extravasation des leucocytes. Les études utilisant la microscopie intravitale ont permis d'identifier une série d' v nements impliqués dans le passage des leucocytes de la circulation sanguine vers les tissus extravasculaires. Sous l'action du flux sanguin, les leucocytes roulent sur l'endothélium adjacent au site d'inflammation. Subséquemment, certains leucocytes adh rent fermement et traversent la barrière de cellules endothéliales (diapédèse). Des études *in vitro* et *in vivo* récentes ont montré que le "rolling" est médié par des interactions de basse affinité entre les sélectines et leurs contre récepteurs et que l'adhésion ferme et la diapédèse sont principalement médiées par des intégrines et des membres de la superfamille des immunoglobulines (Carlos et Harlan, 1994).

1.3.1 Le «rolling»

La première étape, connue sous le nom de «rolling», est caractérisée par l'association et la dissociation rapide entre les L-sélectines lymphocytaires et des glycoprotéines présentes à la surface des cellules endothéliales sous la force exercée par le flux sanguin. L'importance des sélectines dans ce processus a été démontrée par l'utilisation d'anticorps anti L-sélectine. Ceux-ci réduisent de façon significative le «rolling» (Von Andrian et coll., 1991; Ley et coll., 1993) et empêchent le recrutement des leucocytes *in vivo* (Von Andrian et coll., 1991; Watson et coll., 1991).

1.3.2 Activation et adhésion ferme

La seconde étape du recrutement des lymphocytes implique une activation des intégrines lymphocytaires et une synthèse *de novo* de protéines d'adhésions endothéliales (Von Andrian et coll., 1991; Butcher, 1991). Les intégrines présentes à la surface des lymphocytes T circulant sont normalement dans un état inactif ou de faible avidité et ne lient pas, ou très faiblement, leurs ligands endothéliaux. Suite à une activation appropriée (par des cytokines, des chemokines ou des chemoattractants), les intégrines subissent un changement de conformation qui augmente leur affinité pour leurs ligands (Ginsberg et coll., 1992; Hogg et coll., 1993). A cet effet, la chemokine MIP-1 β augmente la liaison de VLA-4 à VCAM-1 (Tanaka et coll., 1993). Suite à l'activation, une adhésion ferme et un aplatissement des lymphocytes sont observés.

1.3.3 La migration transendothéliale

Suite à l'adhésion ferme, les lymphocytes se déplacent à la surface de l'endothélium, un processus nécessitant une adhésion réversible rendue possible par une modulation de l'avidité des interactions (Dustin et Springer, 1989; Stossel, 1993). De cette façon, les lymphocytes peuvent se déplacer jusqu'aux jonctions intercellulaires et, sous l'action des chemokines et chemoattractants, migrer à travers l'endothélium pour s'accumuler au site de blessure ou d'infection. L'interaction des intégrines avec les composants de la matrice extracellulaire est également importante pour la diapédèse. Notons entre autre que les intégrine VLA-4 et VLA-5 reconnaissent la fibronectine présente au niveau de la matrice extracellulaire.

1.4 Régulation de l'expression des molécules d'adhésion

La régulation de l'expression des molécules d'adhésion est essentielle au bon fonctionnement de plusieurs processus biologiques. Par exemple, lors du développement de la rétine, l'expression de la N-cadhérine est modulée par régulation de la transcription ainsi que par un clivage protéolytique qui augmente le «turnover» de la N-cadhérine (Roark et coll., 1992).

En ce qui à trait au système immunitaire, la régulation des interactions adhésives entre les leucocytes et les cellules endothéliales est rendue possible par plusieurs mécanismes. Chez les leucocytes, la modulation de l'avidité des intégrines constitue le principal mode de régulation. Tel que discuté à la section 1.3.2, les intégrines présentes sur les leucocytes circulants sont normalement dans un état inactif ou de basse avidité et ne lie pas, ou

minimalement, leurs ligands endothéliaux. L'activation des intégrines peut se faire par des chemoattractants ou par la réticulation de certaines molécules de surface, incluant le TCR et PECAM-1. L'habileté des intégrines à modifier rapidement leur affinité permet aux leucocytes de circuler librement mais d'adhérer fermement aux sites d'inflammation.

Chez les cellules endothéliales, la modification de l'expression génétique constitue le mode principal de régulation. Plusieurs molécules médiatrices de l'inflammation tels IL-1 et TNF- α stimulent l'expression de ICAM-1, VCAM-1 et de la E-sélectine chez la cellule endothéliale. La régulation s'effectue dans ce cas principalement par une augmentation de la transcription. La fusion à la membrane de granules cytoplasmiques contenant des récepteurs d'adhésion constitue un autre mécanisme de régulation.

Quelques études ont montré un rôle de la PKC dans la régulation de l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1 par les cytokines. Le groupe de Harlan (Deisher et coll., 1993) a montré qu'une inhibition de la PKC diminue l'accumulation de l'ARNm de VCAM-1 et l'expression de la protéine suite à une stimulation par le TNF- α , l'IL-1 β et le LPS. Des résultats similaires ont été obtenus pour l'expression de ICAM-1 (Sung et coll., 1994).

1.5 La protéine kinase C (PKC)

1.5.1 Les isoformes de la PKC

L'activité enzymatique de la PKC a initialement été identifiée dans le cerveau de rat par le groupe de Nishizuka comme un nouveau type de sérine-thréonine kinase cytoplasmique (Inoue et coll., 1977; Takai et coll., 1977). Peu après, le même groupe a montré que la PKC pouvait être activée réversiblement *in vitro* par le diacylglycérol (DAG) en présence de phospholipides acides tel la phosphatidylsérine (PS) (Takai et coll., 1979a, b). Cette observation montrait pour la première fois que les phospholipides pouvaient agir comme messagers secondaires et stimuler la phosphorylation des protéines. On sait maintenant que la PKC constitue une famille de kinases. Douze isoformes (ou isoenzymes), différents dans leurs structures, leurs propriétés enzymatiques et leur expression tissulaire, ont été clonés chez les mammifères. Plusieurs études, basées sur la surexpression, la diminution d'expression par antisens, ou l'utilisation de mutants dominants négatifs ont montré que les différents isoenzymes de PKC possèdent des rôles physiologiques spécifiques (revue par Dekker et Parker, 1994).

La chaîne polypeptidique de tous les isoformes contient des régions conservées et des régions variables et est composée d'un domaine catalytique et d'un domaine de régulation (Nishizuka, 1992). En se basant sur leur structure, les membres de la famille de la PKC peuvent être classés en trois groupes (figure 2). Le groupe A comprend les PKC conventionnelles (PKCc) α , β I et β II générées par épissage alternatif et γ . Ces isoformes possèdent quatre régions conservées (C1-4) et 5 régions variables (V1-5).

Isotype

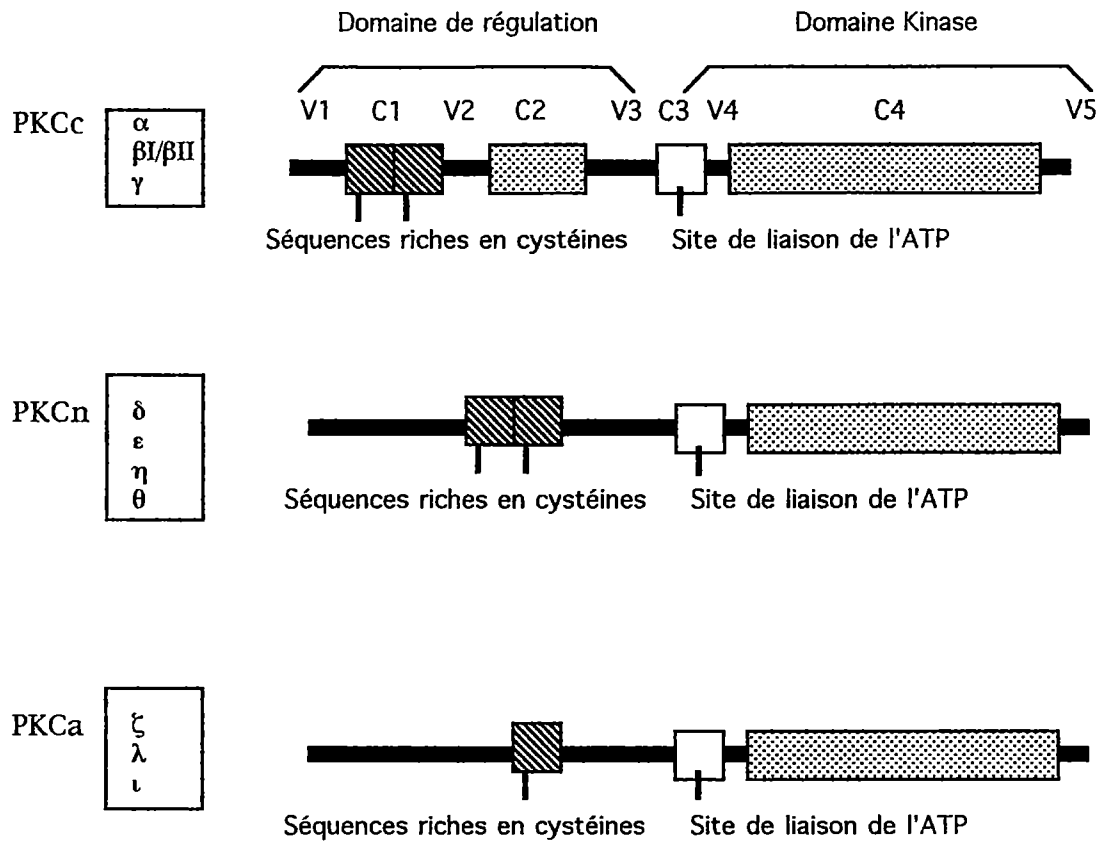


Figure 2. Structure des différents isoformes de la PKC. Les régions conservées (C1-C4) et variables (V1-V5) des PKC conventionnelles sont indiquées.

La région C1 contient un domaine putatif de liaison à la membrane (Ono et coll., 1989a). Cette région contient également deux domaines en doigt de zinc nécessaire à la liaison de l'activateur DAG et des esters de phorbol qui ont la capacité d'imiter le DAG (Nishizuka., 1992). La région C2 est reliée à la sensibilité de l'enzyme au Ca^{2+} . La région C3 contient le site catalytique de l'enzyme et C4 semble être nécessaire à la reconnaissance du substrat à phosphoryler (Nishizuka 1992). Les isoenzymes du groupe conventionnel sont activés par le Ca^{2+} , le PS et le DAG et l'activation peut être augmentée par les acides gras libres et le lysophosphatidylcholine (LysoPC).

Les isoformes du groupe B sont appelés PKC nouvelles (PKCn). Ce groupe comprend les isoformes δ , ϵ , η , θ , ι et μ . Ces isoformes ne possèdent pas le domaine C2 et par conséquent ne sont pas susceptibles à l'activation par le Ca^{2+} .

Le groupes C comprend les isoformes atypiques (PKCa) ζ , ν et λ . Ces isoformes ont les mêmes caractéristiques que les isoformes du groupe B à l'exception qu'ils ne possèdent qu'un seul domaine en doigt de zinc dans la région C1. Ils ne sont pas activables par le DAG ou les esters de phorbol mais peuvent être activés par des acides gras libres et la PS. Les caractéristiques des différents isoformes sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1. Caractéristiques des différents isoformes de la PKC

Isoforme	Nombre de résidus d'acide aminés	Activateurs	Expression tissulaire	Refs.
<u>Groupe A: PKC classiques (PKCc)</u>				
α	672	PS, Ca, DG, AGL, LysoPC	Universel	(1, 2)
βI	671	PS, Ca, DG, AGL, LysoPC	Quelques tissus	(1, 2)
βII	673	PS, Ca, DG, AGL, LysoPC	Plusieurs tissus	(1, 2)
γ	697	PS, Ca, DG, AGL, LysoPC	Cerveau	(1, 2)
<u>Groupe B: PKC nouvelles (PKCn)</u>				
δ	673	PS, DG	Plusieurs tissus	(1, 3, 4)
ϵ	737	PS, DG, AGL	Cerveau et autre	(1, 4, 5)
η	683	PS, DG	Universel	(4, 6, 7)
θ	707	? *	Cellules hématopoïétiques	(8)
<u>Groupe C: PKC atypiques (PKCa)</u>				
ζ	592	PS, AGL, PPI	Universel	(1, 4, 9)
ι	587	PS	Poumon, cerveau, rein	(10)
λ	586	PS, AGL, PPI	Ovaire, testicule	(11)
μ	912	PS	Plusieurs tissus	(12)

* Les activateurs de l'isoforme θ ne sont pas rapportés dans la littérature.

- 1) Nishizuka, 1988
- 2) Bell et Burns, 1991
- 3) Leibersperger et coll., 1990
- 4) Liyanage et coll., 1992
- 5) Koide et coll., 1992
- 6) Osada et coll., 1990
- 7) Bacher et coll., 1991
- 8) Baier et coll., 1993
- 9) Ono et coll., 1989b
- 10) Selbie et coll., 1993
- 11) Akimoto et coll., 1994
- 12) Johannes et coll., 1994

1.5.2 Le pseudosubstrat et l'activation de la PKC

En absence d'activateurs, le domaine de régulation de la PKC se lie au domaine catalytique, résultant en un état inactif de l'enzyme. L'action inhibitrice du domaine de régulation est exercée par un site appelé pseudosubstrat. Ce site contient la séquence consensus de phosphorylation de la PKC à l'exception qu'aucun résidu phosphorylable n'est présent (une alanine est présente plutôt qu'une sérine ou une thréonine). Le modèle d'action du pseudosubstrat propose que celui-ci interagit avec le domaine catalytique et inhibe par le fait même l'activité kinase (House et Kemp., 1987; Pears et coll., 1990). La liaison des activateurs lipidiques au domaine de régulation amène un changement de conformation qui libère le domaine kinase et permet la liaison du substrat (Parker et coll., 1989). Ce modèle est appuyé par les études de mutagenèse qui ont montré qu'une délétion de la séquence du pseudosubstrat de la PKC α rend celle-ci constitutivement active et ce, de façon indépendante de la présence des activateurs lipidiques (Pears et coll., 1990). La mutation de l'alanine en position 25 en acide glutamique produit le même effet (Pears et coll., 1990).

1.5.3 Déterminants de la spécificité des différents isoformes

Tel que discuté à la section 1.4.1, la chaîne polypeptidique des PKC est constituée de régions variables (V) et de régions conservées (C). Certains auteurs ont proposé que les régions conservées représentent des régions impliquées dans des fonctions communes à toutes les PKC et que les régions variables sont responsables des propriétés spécifiques des différents isoformes tel que le choix du substrat à phosphoryler et l'interaction avec différents régulateurs (Carpenter et coll., 1987; Nishizuka., 1989). En accord avec cette

hypothèse, le groupe de Fields a identifié un activateur, le NMAF, qui stimule la PKC β II à phosphoryler la lamine B (Murray et coll., 1994). L'isoforme β I qui possède une séquence identique à l'isoforme β II à l'exception des 50 derniers acides aminés (ce qui correspond au domaine V5) n'est pas activé par le NMAF. Ce résultat montre que les domaines variables, V5 dans ce cas, peuvent conférer des propriétés spécifiques aux différents isoformes. Par contre, d'autres auteurs ont rapporté des résultats suggérant que ce sont les régions constantes qui sont déterminantes dans les interactions avec les cibles cellulaires (Liao et coll., 1994). Ces auteurs ont montré par Western blot comparatifs que les isoformes α et β lient les mêmes protéines dans un extrait de cellules REF52. Les régions variables et les régions conservées sont donc possiblement importantes pour les activités spécifiques des différents isoformes de la PKC.

1.6 Utilisation d'ARN antisens pour diminuer l'expression d'un gène

La technique antisens est un outil important pour l'étude du rôle d'une protéine dans la cellule. Cette technique permet d'interférer avec l'expression d'un gène cible et ce de manière très spécifique. L'ARN antisens peut être produit de deux façons. On peut utiliser de l'ARN transcrit *in vitro* qui sera introduit dans les cellules par microinjection ou à l'aide de liposomes (Murray et Crockett, 1992). On peut également transfecter les cellules cibles avec un plasmide contenant le gène, ou un segment de celui-ci, cloné dans une orientation inversée. Au sein de la cellule, l'ADN antisens est transcrit en un ARN antisens non codant complémentaire à l'ADN et l'ARNm du gène ciblé (Murray et Crockett, 1992).

Les mécanismes par lesquels les ARN antisens permettent d'interférer avec l'expression génétique sont mal compris (Murray et Crockett, 1992). Les plus probables sont:

1) l'hybridation de l'ARN à l'ADN génomique pour former une triple hélice qui bloque la transcription.

2) la formation d'un duplex entre l'ARN antisens et l'ARNm qui:

- provoque la dégradation du messenger par des RNases spécifiques pour l'ARN double brin.
- bloque l'exportation de l'ARNm vers le cytoplasme
- interfère avec l'épissage
- amène une inhibition de la traduction.

1.7 But du travail

A) Tel que discuté à la section 1.4, quelques études ont montré un rôle de la PKC dans l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 chez les cellules endothéliales. Ces résultats ont été obtenus en utilisant des inhibiteurs ou des activateurs de la PKC et ne permettent pas d'identifier le ou les isoformes impliqués puisque ceux-ci ne présentent pas de spécificité particulière pour les différents isoformes (présentement, il n'existe pas d'activateurs ou d'inhibiteurs spécifiques pour les isoformes de la PKC à l'exception d'un inhibiteur de la PKC β - Ishii et coll., 1996). Afin d'identifier un ou des isoformes impliqués dans l'expression de ICAM-1 et VCAM-1, nous avons

transfecté de façon stable la lignée de cellules humaines endothéliales ECV 304 avec des plasmides encodant les ADNc complets des isoformes α , ϵ et ζ de la PKC dans les orientations sens et antisens afin de surexprimer ou de diminuer spécifiquement l'expression de ces isoformes.

B) Tel que discuté, l'accumulation des leucocytes au site d'infection ou de lésion nécessite le passage de ceux-ci à travers la paroi de cellules endothéliales. Plusieurs résultats suggèrent qu'une réorganisation des microfilaments d'actine du cytosquelette des cellules endothéliales est un élément important dans le processus de diapédèse (Doukas et coll., 1987; Paterson et coll., 1989). Le résultat le plus convaincant a été obtenu par le groupe de Korthuis (Asako et coll., 1992). Ces auteurs ont montré que le prétraitement de cellules endothéliales à la phalloïdine, un agent qui permet de conserver l'intégrité des jonctions intercellulaires en stabilisant les filaments d'actine, inhibe l'extravasation leucocytaire, sans influencer l'adhésion. Des résultats obtenus au laboratoire ont montré que l'occupation de VCAM-1 par un anticorps monoclonal active la voie de dégradation du PIP2 chez les cellules ECV 304 (Ricard et coll., non publié). L'IP3 et le DAG générés sont deux seconds messagers ayant un effet direct sur l'activation de la PKC. Nous avons utilisé les cellules transfectées avec les ADNc des PKC α , ϵ et ζ dans les orientations sens et antisens afin de vérifier l'hypothèse que ces isoformes de la PKC seraient impliqués dans le réarrangement du cytosquelette. Un tel réarrangement pourrait faciliter le passage des lymphocytes T à travers l'endothélium.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel

Les produits suivants: M199, pénicilline, streptomycine, DTT, aprotinine, benzamidine, les anticorps anti PKC α , $\beta 1$, $\beta 2$, ϵ ainsi que l'anti Ig de lapin couplé à la peroxydase proviennent de la compagnie Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO). Le sérum FBS a été acheté de Intergen (Purchase, NY). Le milieu OPTI MEM, la lipofectamine, la généticine (G418) et les anticorps anti PKC γ , δ et ζ ont été obtenus de Gibco BRL (Montréal). Le [α - ^{32}P] dCTP ainsi que les membranes Hybond N et Hybond C extra ont été achetés de la compagnie Amersham (Montréal).

Les enzymes de restriction proviennent de la compagnie Pharmacia (Montréal). Le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3 a été obtenu de la compagnie Invitrogen (San Diego CA). Les ADNc encodant les PKC α , ϵ et ζ proviennent de chez American Type Culture Collection (Rockville MD).

2.2 Méthodes

2.2.1 Culture cellulaire

La lignée de cellules endothéliales ECV 304 utilisée pour nos études a été établie à partir du cordon ombilical humain et a été achetée chez ATCC (Rockville MD). Les cellules ont été maintenues dans du milieu M199 contenant de la pénicilline (100 unités/ml), de la streptomycine (100 µg/ml) et de la garamycine (40 ng/ml). Le milieu a été supplémenté avec 10% de sérum foetal bovin inactivé par la chaleur (56°C, 30 minutes).

2.2.2 Construction des plasmides

Toutes les constructions ont été faites selon des méthodes standard (Sambrook et coll., 1989).

2.2.2.1 Construction de pcDNA3/PKC α et de pcDNA3/CKP α

Un fragment EcoR I de 2.3 Kb contenant l'ADNc complet de la PKC α humaine été isolé du vecteur hôte pBluescript KS+ (ATCC, Rockville, MD) et a été sous cloné dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA) au site EcoR I préalablement déphosphorylé par la phosphatase alcaline (Pharmacia, Montréal), en utilisant le protocole fourni par la compagnie. Des bactéries XL-1 rendues compétentes par traitement au CaCl₂ ont été transformées et les colonies obtenues ont été analysées pour la présence du produit de ligation par digestion au site EcoR I. L'orientation de l'insert a été déterminée par digestion aux sites BamH I. Un clone contenant les fragments

correspondant à l'orientation sens (6863, 617 et 210 pb) a été isolé et nommé pcDNA3/PKC α . Un clone donnant les tailles attendues pour l'orientation antisens (6000, 1480 et 210 pb) a également été isolé et nommé pcDNA3/CKP α . Les orientations ont été confirmées par digestions aux sites Sca I.

2.2.2.2 Construction de pcDNA3/PKC ϵ et pcDNA3/CKP ϵ

Le vecteur PKCepsilon (E3) obtenu de la compagnie ATCC a été digéré par l'enzyme de restriction Nhe I pour donner un fragment Nhe I de 2.2 Kb contenant l'ADNc complet de l'isoforme epsilon humain de la protéine kinase C. Ce fragment a été sous cloné au site Xba I (site compatible à Nhe I) du vecteur pcDNA3 préalablement déphosphorylé. Des bactéries XL-1 ont été transformées et analysées pour la présence de produits de ligation. L'orientation de l'insert des clones isolés a été évaluée par une carte de digestion utilisant les enzymes EcoR V et Hind III. Un clone possédant l'insert dans l'orientation sens nommé pcDNA3/PKC ϵ et un clone possédant l'insert orienté de façon antisens nommé pcDNA3/CKP ϵ ont été isolés.

2.2.2.3 Construction de pcDNA3/PKC ζ et de pcDNA/CKP ζ

Un fragment EcoR I-Xba I de 2 Kb contenant l'ADNc complet de la PKC ζ humaine a été isolé du vecteur hôte pBluescript SK- (ATCC, Rockville, MD) et a été sous cloné aux sites EcoR I-Xba I du vecteur pcDNA3. Des bactéries XL-1 ont été transformées et la présence du produit de ligation a été déterminée par digestions avec les enzymes EcoR I, Xba I et Cla I. Un clone positif contenant l'ADN complémentaire de la PKC ζ en orientation sens a été obtenu et nommé pcDNA3/PKC ζ .

Un fragment EcoR I-Bgl II contenant les nucléotides 1 à 1076 de l'ADNc de la PKC ξ a été isolé du vecteur hôte pBluescript SK- (ATCC, Rockville, MD) et a été sous cloné dans l'orientation antisens dans le vecteur pcDNA3 digéré aux sites BamH I (compatible à Bgl II) et EcoR I. Les mêmes étapes que celles décrites précédemment ont été utilisées pour isoler un clone. L'orientation a été confirmée par l'établissement d'une carte de restriction avec les enzymes EcoR I, Bgl II et Cla I et le clone a été nommé pcDNA3/ CKP ξ .

2.2.3 Transfection des constructions plasmidiques

La lipofectamine, un mélange des liposomes DOSPA et DOPE dans un rapport 3:1 (p/p), a été utilisée comme agent de transfection. Le protocole utilisé a été adapté de celui fourni avec le produit par la compagnie Gibco BRL. Les cellules ECV 304 ont été cultivées dans des puits de 35 mm jusqu'à 50 à 70% de confluence. Pour chaque transfection, 10 μ l de lipofectamine diluée dans 90 μ l de milieu OPTI MEM (Gibco BRL) a été incubée pendant 45 minutes à la température de la pièce avec 4 μ g d'ADN (préparé à l'aide de colonnes Quiagen (Quiagen Inc, Chatsworth, CA) et resuspendu dans de l'eau) dilué dans 100 μ l de milieu OPTI MEM. Suite à l'incubation, le mélange a été dilué avec 800 μ l de milieu OPTI MEM. Le mélange de lipofection (1 ml) a été déposé sur les cellules préalablement lavées avec 2 ml de milieu M199. Les cellules ont été incubées à 37 °C pendant 6 à 8 heures. Par la suite, le milieu de transfection a été dilué avec 1 ml du milieu M199 complet contenant 20% de FBS et les cellules ont été remises à l'incubateur pour une période 24 heures. Suite à cette incubation, le milieu a été changé pour 2 ml de milieu M199 complet. Soixante-douze heures post-transfection, les cellules ont été passées à une dilution de 1/10 et sélectionnées avec 0.6 mg/ml (concentration réelle ajustée en fonction de

l'activité) de G418. Le milieu a été remplacé par du milieu frais à tous les 7 jours. La sélection était complète après 3 à 4 semaines. Les cellules ont été utilisées entre les passages 5 et 20 post-sélection.

2.2.4 Techniques utilisées pour la mise en évidence des différents isoformes de la PKC exprimés chez les cellules ECV 304 et la mesure des niveaux de PKC dans les cellules transfectées avec les vecteurs pcDNA3/PKC α et pcDNA3/CKP α .

2.2.4.1 Extraction des protéines

Les cellules ECV 304 ont été cultivées jusqu'à confluence dans des boîtes de 75 cm². Le milieu de culture a été remplacé par 10 ml de PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5.4 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄ pH 7.4), les cellules ont été grattées, transférées dans des tubes coniques de 50 ml et centrifugées à 800g pendant 5 minutes. Les culots cellulaires ont été resuspendus dans 500 μ l d'un tampon Tris (50 mM Tris, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, pH 7.5) auquel on a ajouté: 5 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 mM benzamidine, 50 μ g aprotinine et 1% NP-40. Le lysat cellulaire a été mélangé sur un appareil vortex pendant 20 secondes, déposé sur glace 20 minutes et centrifugé à 4 °C pendant 15 minutes à 16 000g. Le surnageant (500 μ l) a été récupéré et concentré environ 15 fois sur filtre centrifugeable NanoSpin Plus (Gelman Sciences, Montréal). Les protéines ont été dosées en utilisant l'essai protéique basé sur la méthode de Bradford (Bradford, 1976) de la compagnie Bio-Rad (Richmond, CA) et conservées à 4 °C jusqu'à utilisation.

2.2.4.2 Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Cinquante µg des protéines préparées à la section 2.2.4.1 ont été séparées selon la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970) sur un gel SDS-PAGE (gel concentrateur 5%, séparateur 12%) en utilisant l'unité d'électrophorèse Mini-PROTEAN II de la compagnie Bio-Rad. Pour ce faire, un volume égal à celui des protéines de tampon de charge (Sambrook et coll., 1989) a été ajouté à l'échantillon protéique et celui-ci a été chauffé à 100 °C pendant 3 minutes. Les échantillons ont été déposés sur gel et l'électrophorèse a été effectuée à 120 volts dans un tampon Tris-glycine (Sambrook et coll., 1989).

Les protéines ont par la suite été transférées sur une membrane Hybond-C extra (Amersham, Montréal) en utilisant le système Mini Trans-Blot cell de la compagnie Bio-Rad. Pour ce faire, suite à l'électrophorèse, le gel a été équilibré dans le tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% méthanol) pendant 10 minutes. Parallèlement, la membrane a été mouillée dans de l'eau déionisée et placée pendant 10 minutes dans le tampon de transfert. L'appareil de transfert a été assemblé selon les instructions du manufacturier et le transfert effectué à 80 volts pendant 2 heures à 4 °C.

2.2.4.3 Détection des isoformes de la PKC

Suite au transfert, la membrane a été colorée au rouge de ponceau (0.1% de rouge de ponceau dans 7% d'acide acétique), coupée au besoin et lavée au TBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl pH 7.6). La membrane a été placée dans un sac scellable à la chaleur et traitée avec du tampon TBS auquel on a ajouté 5% de lait écrémé en poudre (p/v) et 0.1% de Tween 80. Le traitement a été effectué avec agitation circulaire soit 1 heure à température de la pièce ou toute la nuit

à 4 °C. Par la suite, la membrane a été lavée 2 fois pendant 5 minutes, avec changement de la solution de lavage après le premier 5 minutes, dans du TBS contenant 0.1% de Tween 80 (TBS-T) et incubée pendant 1 heure à la température de la pièce avec agitation rotative avec les anticorps polyclonaux anti PKC. Les dilutions d'anticorps (Sigma chemical, St-Louis, MO) utilisées sont les suivantes: 1/20000 pour l'anti α , 1/2500 pour l'anti β 1, 1/1000 pour l'anti β 2 et l'anti ϵ . Les anticorps anti γ , δ et ζ obtenus de chez Gibco BRL ont été utilisés à une concentration de 2 mg/ml.

La membrane a par la suite été lavée de la façon décrite précédemment et incubée pendant 1 heure avec le second anticorps, un anti IgG de lapin couplé à la peroxydase (Sigma chemical, St-Louis, MO) utilisé à une dilution 1/30000. La membrane a de nouveau été lavée et les bandes positives ont été détectées en utilisant le système de chemiluminescence de la compagnie Boehringer Mannheim. La membrane a alors été enveloppée dans une pellicule plastique, placée dans une cassette et exposé pendant différents temps à des films XRP de la compagnie Kodak.

2.2.4.4 Quantification des immunoblots

Les films ont été reproduits électroniquement en utilisant un "scanner" et l'intensité relative des bandes de l'image digitalisée a été déterminée en utilisant le logiciel Image Quant de la compagnie Molecular Dynamics (Sunnyvale, CA).

2.2.5 Étude de cytofluorimétrie

Les cellules ont été lavées dans du milieu M199 contenant 0.25% de BSA puis resuspendues dans ce même milieu à une concentration de 10^7 cellules/ml. A 50 μ l de cette préparation, 10 μ l d'anticorps monoclonal IgG1 anti-ICAM-1 ou VCAM-1 humain produit chez la souris (Cederlane laboratories, Hornby, ON) ont été ajoutés et le tout a été incubé à 4 °C pendant 30 minutes. Les cellules ont été lavées avec 5 ml de tampon PBS froid (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5.4 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄ pH 7.4), centrifugées pendant 5 minutes à 450xg et incubées à 4 °C pendant 30 minutes avec un anti-immunoglobuline de souris conjugué à la fluorescéine (Cooper Biomedicals, Malven, PA) dilué 1/200. Les cellules ont été lavées avec 5 ml de tampon PBS froid, centrifugées pendant 5 minutes à 450g et resuspendues dans 500 μ l de tampon PBS froid. Les lectures ont été faites sur un appareil FACScan de la compagnie Becton-Dickinson (Mississauga, Ontario) et l'analyse a été effectuée avec le logiciel conçu par la même compagnie.

2.2.6 Mise en évidence des filaments d'actine par fluorescence

Les cellules ont été cultivées sur des lamelles rondes de 1.2 cm jusqu'à 50% de confluence. Elles ont été lavées deux fois pendant 5 minutes dans du tampon PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5.4 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄ pH 7.4) puis fixées pendant 30 minutes dans une solution de paraformaldéhyde à 4% (p/v) dans un tampon phosphate 100 mM (100 mM Na₂HPO₄, pH 7.4). Les cellules ont été perméabilisées par traitement au Triton X-100 (0.5%, 15 minutes), lavées deux fois pendant 10 minutes dans le tampon PBS puis les sites non spécifiques ont été bloqués par un traitement de 30 minutes avec une solution de lait en

poudre 5% (p/v) dans le tampon PBS. Par la suite, les cellules ont été traitées pendant 1 heures à 4 °C avec une solution PBS-glycine 0.1 M afin de diminuer les liaisons non-spécifiques (la glycine réagit avec les fonctions aldéhyde et empêche la formation de liaisons covalentes sur ce groupement). Les cellules ont été lavées deux fois pendant 10 minutes avec le tampon PBS puis incubées à l'obscurité pendant 20 minutes avec 0.5 unité (dans 300 µl de MeOH) de phalloïdine conjuguée à la rhodamine (Molecular Probes, Eugene, OR). Trois lavages avec le tampon PBS ont été faits et les lamelles ont été montées sur lame de verre recouverte de Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) puis scellées avec du vernis à ongle. La visualisation des filaments a été faite sur un microscope à inversion de la compagnie Nikon (Mississauga, Ontario) en excitant à 550 nm et en collectant la fluorescence émise à 580 nm. La source de lumière a été générée par une lampe au xénon de 150 W. Un miroir dichroïque DM580 (Nikon, Mississauga, Ontario) et un filtre barrière BA 590 (Nikon, Mississauga, Ontario) ont été utilisés. Les photos ont été prises en utilisant une caméra couplée au microscope.

3. Résultats

3.1 Isoformes de la PKC exprimés par la lignée cellulaire ECV 304.

Une étude récente a montré que les cellules endothéliales du cordon ombilical humain (HUVEC) expriment les isoformes α , β (les auteurs n'ont pas discriminé β I et β II), ϵ et ζ de la PKC mais n'expriment pas les isoformes γ et δ (Mattila et coll., 1994). Afin de déterminer si la lignée ECV 304 (établie à partir du cordon ombilical humain) utilisée pour nos études exprimait les mêmes isoformes, des études de type Western ont été réalisées. Tel que montré en figure 3, la lignée de cellules ECV 304 exprime tout comme les HUVEC les isoformes α , β (β I), ϵ et ζ de la PKC. La présence des isoformes β II, γ et δ n'était pas détectable (résultats non montrés). Ces études préliminaires nous ont permis d'identifier les isoformes de la PKC à étudier.

3.2 Transfection stable des plasmides pour la surexpression et la diminution d'expression des isoformes α , ϵ et ζ de la PKC dans les cellules ECV 304.

Les isoformes α , ϵ et ζ de la PKC ont été choisis pour nos études puisqu'ils représentent les trois classes de PKC, soit les conventionnelles, les nouvelles et les atypiques (cependant, le manque de temps nous a contraint à réaliser les essais qu'avec l'isoforme α). Les ADNc de ces isoformes ont été clonés dans les orientations sens (pour la surexpression) et antisens (pour diminuer l'expression) dans le vecteur d'expression eucaryote pcDNA3 (figure 4) tel que décrit à la section 2.2.2.

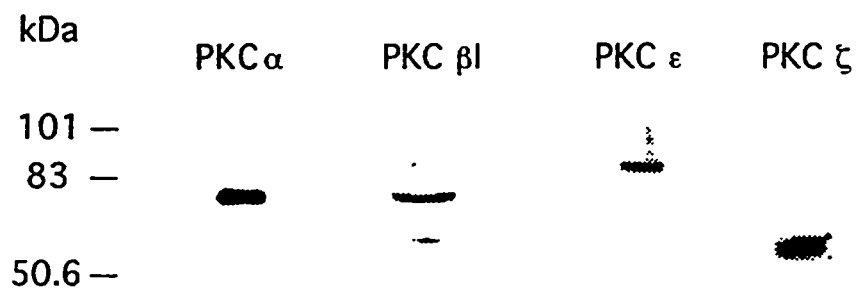


Figure 3: Isoformes de PKC exprimés par la lignée de cellules endothéliales ECV 304. L'extrait protéique total (50 μ g) a été séparé sur SDS-PAGE, transféré sur membrane de nylon, incubé avec les anticorps anti-PKC appropriés puis avec un anti-Ig couplé à la peroxydase. La révélation a été faite par chemiluminescence.

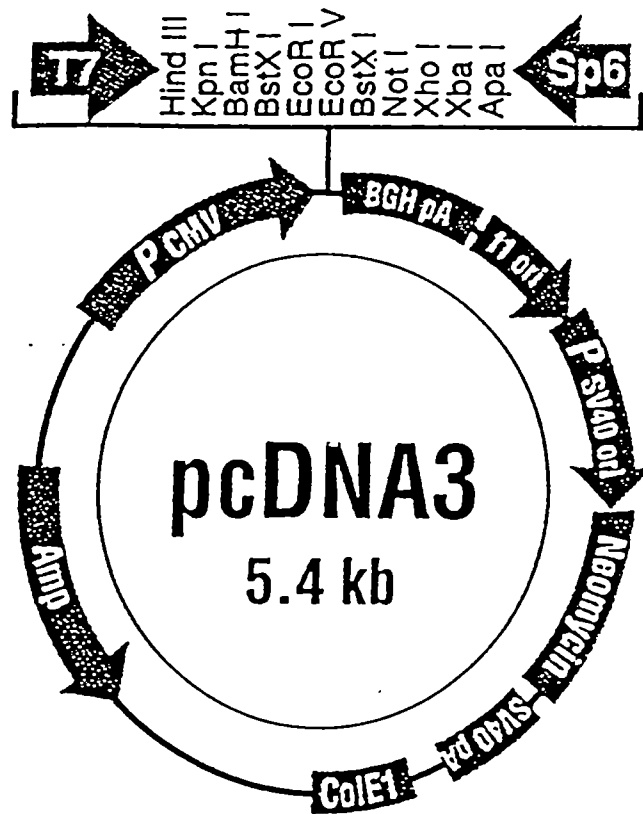


Figure 4. Représentation schématique du vecteur d'expression eucaryote pcDNA3.

Ce vecteur contient: 1) le promoteur du cytomégalo virus (CMV) permettant un haut niveau de transcription; 2) le signal de polyadénylation et la séquence de terminaison de transcription du gène de l'hormone de croissance bovine (BGH) pour augmenter la stabilité de l'ARN et 3) le gène de résistance neo permettant la génération de lignées stables par sélection au G418.

La stratégie utilisée pour la génération des lignées stables exprimant les constructions est la suivante: les plasmides pcDNA3/PKC α , pcDNA3/CKP α , pcDNA3/PKC ϵ , pcDNA3/CKP ϵ , pcDNA3/PKC ζ et pcDNA3/CKP ζ ont été transfectés dans les cellules ECV 304 en utilisant la lipofectamine. Des cellules ont également été transfectées avec le vecteur seul pour servir de témoin lors des essais. Suite à la transfection, les cellules ont été sélectionnées dans le milieu M199 complet contenant 0.6 mg/ml de G418. La sélection était complète après 3 à 4 semaines et les cellules ont alors été utilisées pour les différents essais.

3.3 Mesure des niveaux de PKC α dans les transfectants ECV/PKC α et ECV/CKP α .

Afin de vérifier si l'expression de l'isoforme α de la PKC était modifiée dans les transfectants ECV/PKC α et ECV/CKP α , des analyses de type Western ont été réalisées. Pour ce faire, les protéines ont été extraites et dosées tel que décrit à la section 2.2.4.1, une même quantité de protéine a été séparée dans chaque piste par SDS-PAGE, transférée sur membrane de nitrocellulose, incubée avec un anticorps polyclonal anti-PKC α puis un anti-Ig couplé à la peroxydase et la révélation a été faite par chemiluminescence. Les résultats d'un des trois

essais effectués sont présentés à la figure 5. Les films ont été reproduits électroniquement à l'aide d'un "scanner" et des analyses densitométriques ont été effectuées sur les images digitalisées à l'aide du logiciel Image Quant. La moyenne des trois essais différents indique (par rapport aux cellules témoin ECV/pcDNA3) une baisse d'expression de 64% de la PKC α chez les transfectants ECV/CKP α et une augmentation de 36% chez les transfectants ECV/PKC α (tableau 2).

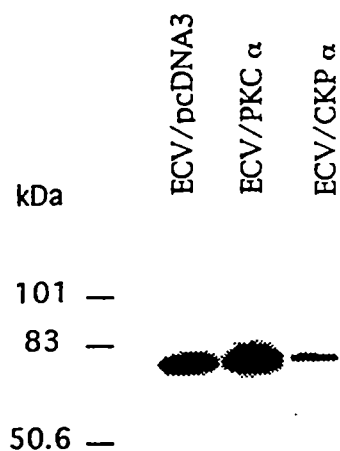


Figure 5. Analyse Western des transfectants ECV/PKC α et ECV/CKP α . 50 μ g des extraits protéiques ECV/pcDNA3, ECV/PKC α et ECV/CKP α ont été séparés sur SDS-PAGE et transférés sur membrane de nitrocellulose. La membrane a été incubée successivement avec un anticorps polyclonal anti-PKC α puis un anti-Ig couplé à la peroxydase et la révélation a été faite par chemiluminescence.

Essai	Quantité de l'isoforme α de la PKC dans les transfectants ECV/CKP α (en % du témoin)	Quantité de l'isoforme α de la PKC dans les transfectants ECV/PKC α (en % du témoin)
1	25	132
2	54	141
3	13	134
Moyenne	30.6	136

Tableau 2: Quantification de l'isoforme α de la PKC dans les transfectants ECV/CKP α et ECV/PKC α . L'immunoblot a été révélé par chemiluminescence, le film a été reproduit électroniquement en utilisant un "scanner" et l'intensité relative des bandes a été déterminée à l'aide du logiciel Image Quant. Les valeurs représentent le pourcentage de PKC α dans les transfectants par rapport aux cellules témoin, ECV/pcDNA3, de trois essais différents.

3.4 Évaluation de la reproductibilité des immunoblots

Afin de déterminer la validité de notre méthode de quantification, les protéines de deux échantillons différents de cellules ECV 304 ont été extraites, dosées séparément et la même quantité de protéines a été séparée par SDS-PAGE. Un immunoblot a été réalisé (figure 6) et la quantité de PKC α de chaque échantillon a été évaluée par mesure densitométrique. Les mesures réalisées à partir de deux expériences différentes donnent respectivement un pourcentage d'écart de 16% et 25% entre les deux échantillons.

3.5 Analyse de l'organisation des filaments d'actine chez les transfectants ECV/PKC α et ECV/CKP α par fluorescence

Chez les cellules ECV 304, les filaments d'actine se présentent en fluorescence sous la forme de fibres de stress qui parcourent la cellule de façon transversale (figure 7a). Nous avons vérifié si des modifications au niveau des filaments d'actine étaient présentes chez les transfectants ECV/PKC α et ECV/CKP α . Tel que montré en figure 7b et 7c, l'aspect des filaments d'actine n'est pas modifié chez les cellules transfectées avec le vecteur seul ni chez les cellules surexprimant la PKC α . Par contre, chez les cellules ECV/CKP α , il y a disparition de ces fibres de stress (figure 7d). Chez les cellules traitées de façon chronique au phorbol ester (160 nM/24 heures), un protocole qui diminue l'activité des PKC ϵ et PKC η , les filaments d'actine sont dépolymérisés

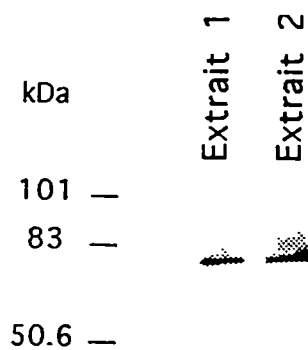


Figure 6. Évaluation de la reproductibilité des immunoblots. Les protéines de deux échantillons différents de cellules ECV 304 ont été extraites et dosées séparément. L'extrait protéique (50 μ g) a été séparé sur SDS-PAGE et transféré sur membrane de nitrocellulose. La membrane a été incubée successivement avec un anticorps polyclonal anti-PKC α puis un anti-Ig couplé à la peroxydase et la révélation a été faite par chemiluminescence. Les résultats d'un des deux essais effectués sont présentés.

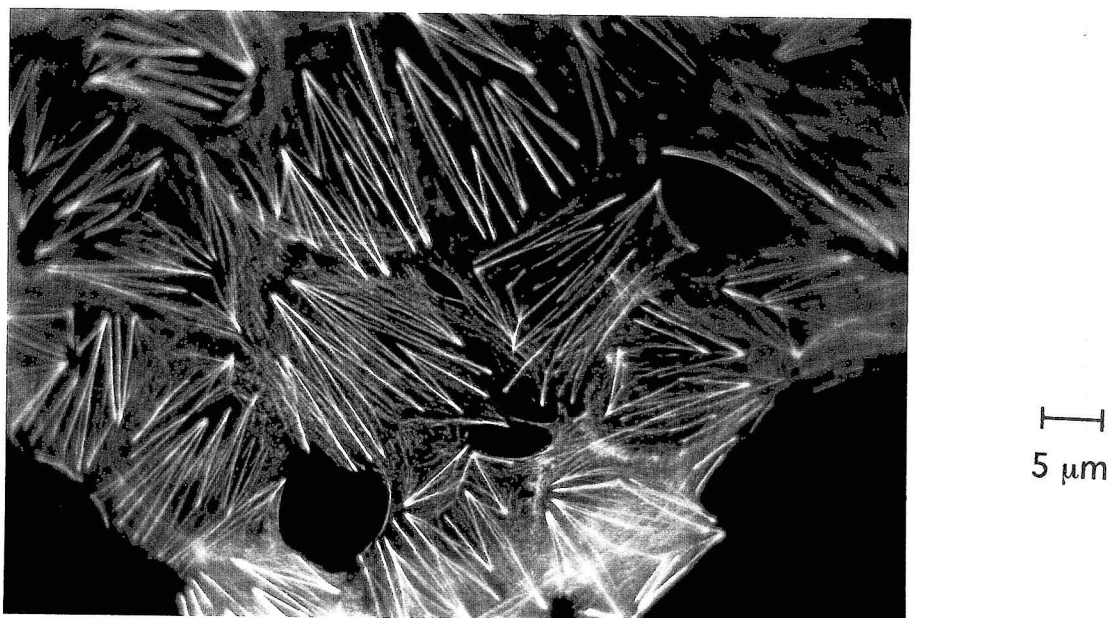


Figure 7a. Mise en évidence des filaments d'actines des cellules ECV 304 par fluorescence. Les cellules ont été cultivées jusqu'à 50% de confluence, fixées à la paraformaldehyde puis perméabilisées par un traitement au triton X-100. Les sites ont été bloqués en utilisant une solution de lait en poudre 5% puis les cellules ont été incubées avec de la phalloïdine conjuguée à la rhodamine.

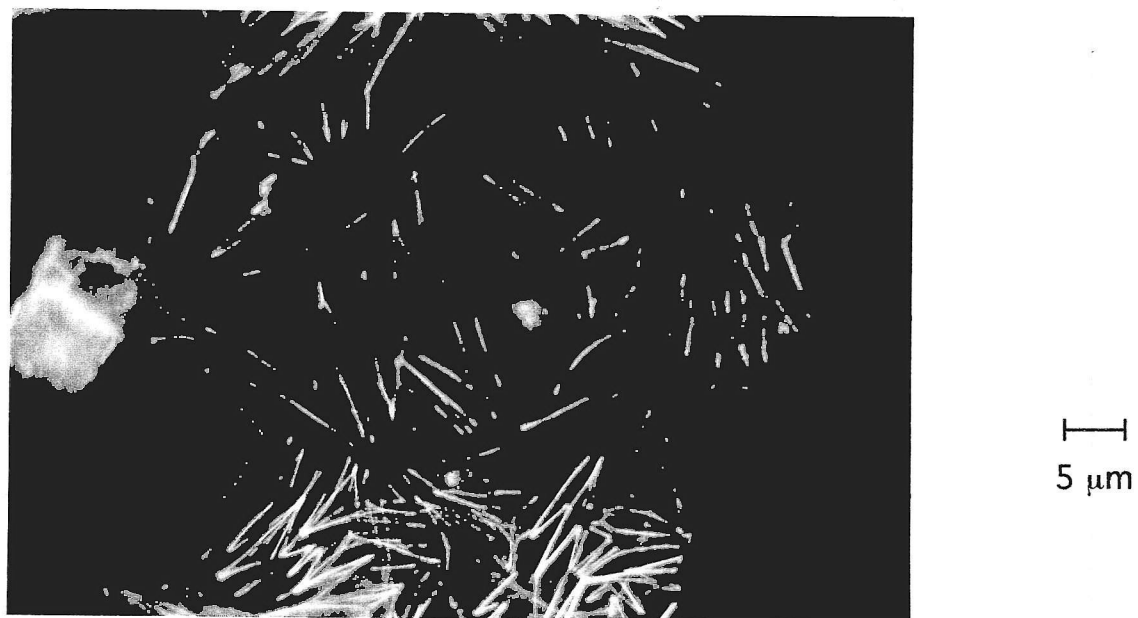


Figure 7b. Mise en évidence des filaments d'actine chez les cellules ECV/pcDNA3.



Figure 7c. Mise en évidence des filaments d'actine chez les cellules ECV/PKC α .

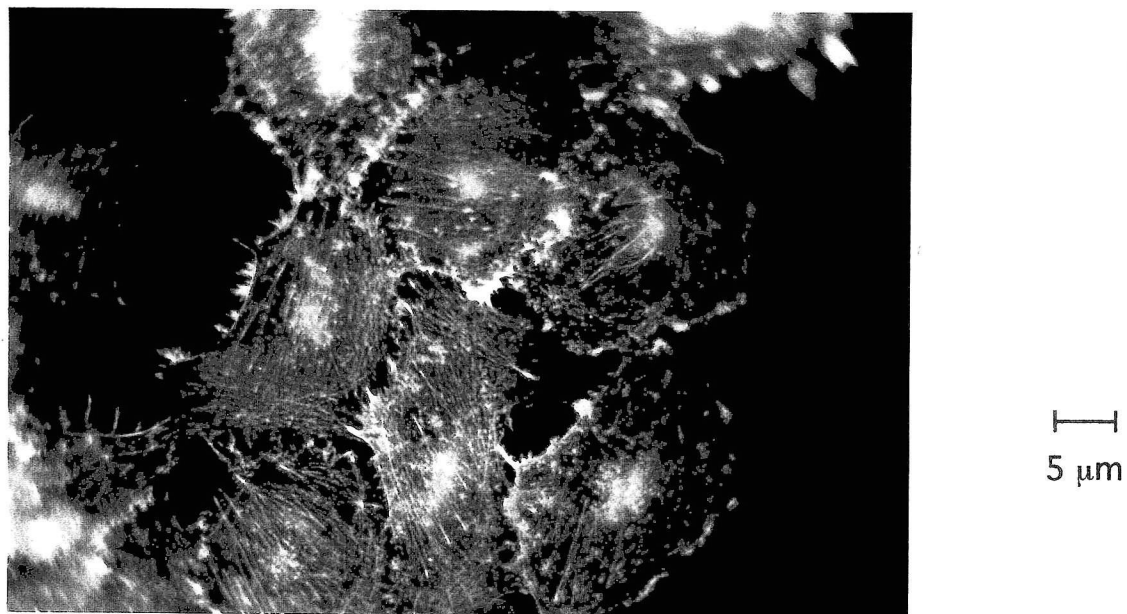


Figure 7d. Mise en évidence des filaments d'actine chez les cellules ECV/CKP α .

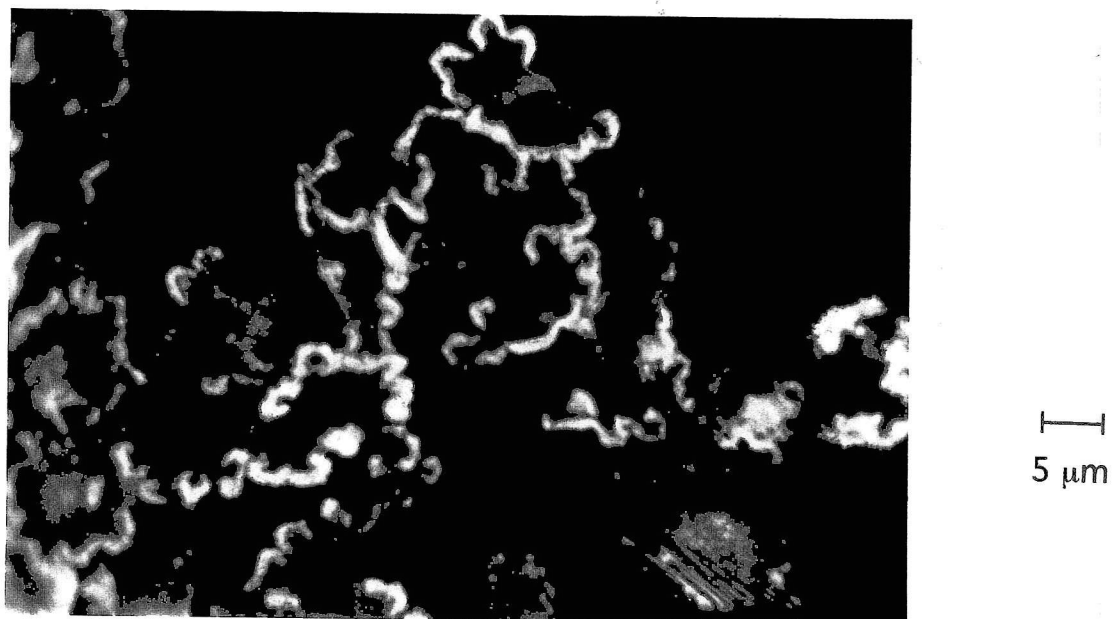


Figure 7e. Mise en évidence des filaments d'actine chez les cellules ECV 304 traitées avec 160 nM de PMA pendant 24 heures.

et on observe la présence de points focaux d'actine en périphérie de la cellule (figure 7e).

3.6 Expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 chez les transfectants ECV/PKC α et ECV/CKP α .

Quelques études ont montré un rôle de la PKC dans l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 par les cellules endothéliales (Sung et coll., 1994; Deisher et coll., 1993). Nous avons déterminé si l'expression de ICAM-1 et de VCAM-1 était modifiée dans les transfectants ECV/PKC α et ECV/CKP α par cytométrie de flux (FACS). Les résultats présentés dans le tableau 3 montrent que la totalité (plus de 99%) des cellules témoin, ECV/pcDNA3, expriment ICAM-1 et que l'expression de cette molécule d'adhésion n'est pas modifiée dans les transfectants ECV/PKC α et ECV/CKP α . L'activation préalable des cellules au phorbol ester (16 nm, 30 minutes), qui permet l'activation des PKCc et PKCn, n'altère pas le patron d'expression. En ce qui a trait à la molécule d'adhésion VCAM-1, son expression est augmentée de 10.5% chez les transfectants ECV/PKC α et de 14% chez les transfectants ECV/CKP α par rapport aux cellules témoin ECV/pcDNA3. L'activation de la PKC par traitement au phorbol ester amène une augmentation de l'expression de VCAM-1 de 20.5% chez les cellules ECV/pcDNA3, de 6.3% chez les cellules ECV/PKC α et de 1.8% chez les cellules ECV/CKP α .

Lignée cellulaire	Expression de ICAM-1 (%)		Expression de VCAM-1 (%)	
	-PMA	+PMA	-PMA	+PMA
ECV/pcDNA3	99.6	99.7	1	21.5
ECV/PKC α	99.5	99.6	11.5	17.8
ECV/CKP α	99.5	99.1	15	16.8

Tableau 3. Expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 chez les transfectants ECV/PKC α et ECV/CKP α . Les cellules ont été incubées directement (-PMA), ou suite à un prétraitement avec 16 nm de phorbol ester pendant 30 minutes (+PMA), avec les anticorps anti-ICAM-1 ou anti-VCAM-1. Les cellules ont par la suite été incubées avec un anti-Ig couplé à la fluorescein et l'expression de ICAM-1 et de VCAM-1 a été analysé par cytométrie de flux (FACS). Les cellules ECV/pcDNA3 ont été utilisées comme témoin. Les valeurs (moyenne de deux essais) donnent le pourcentage des cellules exprimant le marqueur.

4.0 Discussion

4.1 La technique antisens comme moyen d'étude du rôle des isoformes de la PKC

La PKC constitue une famille d'isoenzymes, possédant une activité Ser/Thr kinase, dont douze isoformes ont été décrits jusqu'à présent (Dekker et Parker, 1994). Il est maintenant clairement établi dans la littérature que les isoformes de la PKC possèdent des fonctions biologiques différentes (Dekker et Parker, 1994). Cependant, dû à l'absence d'inhibiteurs spécifiques pour ces isoformes, il a été difficile jusqu'à tout récemment de déterminer leurs rôles particuliers. L'utilisation de la technologie antisens, entre autre, a apporté une approche nouvelle à ce problème. Cette technique repose sur le fait que l'expression d'une protéine peut être inhibée par l'hybridation d'une séquence nucléotidique complémentaire à l'ARNm encodant la protéine (Murray et Crockett, 1992). Dans cette étude, nous avons tenté de déterminer un ou des rôles spécifiques de l'isoforme α de la PKC dans la physiologie des cellules endothéliales humaines (ECV 304) par l'utilisation de la technique antisens ainsi que par des essais de surexpression.

4.2 Isoformes de la PKC exprimés par la lignée de cellules endothéliales humaines ECV 304

Tel que montré en figure 3 et discuté à la section 3.1, la lignée de cellules endothéliales ECV 304 exprime les isoformes α , βI , ϵ et ζ de la PKC mais n'exprime pas les isoformes γ et δ . Ces résultats indiquent que la lignée cellulaire utilisée pour nos études exprime les mêmes isoformes de PKC que les

cellules non transformées dont elle dérivent, les HUVEC (Mattila et coll., 1994). Ces études préliminaires ont permis d'identifier les isoenzymes à étudier.

D'autre part, notre étude apporte une connaissance nouvelle sur les isoformes de PKC exprimés par les cellules du cordon ombilical humain. Les résultats de la littérature (Mattila et coll., 1994) indiquent que ce type de cellules expriment l'isoforme β de la PKC sans faire la distinction entre βI et βII . Nos résultats montrent que l'isoforme βI est exprimé mais qu'il y a absence de l'isoforme βII .

4.3 Validité de la méthode de quantification par Western

La majeure partie de notre étude repose sur les différences d'expression des isoformes de la PKC retrouvées dans les transfectants ECV/PKC α et ECV/CKP α . Afin de s'assurer de la validité des résultats concernant les niveaux de PKC α dans les différents transfectants, nous avons tenté d'estimer la précision de notre méthode de quantification en mesurant la quantité de PKC α de deux échantillons de cellules ECV 304, en supposant qu'une même quantité de PKC α devrait être retrouvée dans les deux échantillons puisqu'ils proviennent du même type cellulaire et qu'ils ont été préparés dans les mêmes conditions. Les résultats présentés à la figure 6 et commentés à la section 3.4, montrent qu'un pourcentage d'erreur d'environ 25% doit être attribué à nos valeurs. Ces résultats montrent également qu'une variabilité est présente entre différents essais.

4.4 Niveaux d'expression de la PKC α dans les transfectants

Les résultats de l'immunoblot présentés à la figure 5 montrent que les niveaux de PKC α sont diminués chez les transfectants ECV/CKP α . Les mesures densitométriques de trois immunoblots différents indiquent une diminution d'expression de 70% (Tableau 2). L'incertitude apportée par la méthode de quantification (section 4.3) donne une diminution d'expression de 70 \pm 25% donc une diminution d'au moins 45%. En ce qui a trait aux cellules transfectées avec la construction sens, les résultats présentés à la figure 5 et au tableau 2 montrent une augmentation de 36 \pm 25% par rapport aux cellules transfectées avec le vecteur seul.

Cependant, il est impossible de conclure que les variations de niveau d'expression observées sont dues à l'expression des constructions puisque la procédure expérimentale n'a pas été faite de façon assez rigoureuse. La principale lacune réside dans le fait que les transfectants ont été produits à partir de cellules ne possédant pas le même nombre de passages. Par le fait même, les différences d'expression de la PKC α pourraient être le reflet d'une sélection de populations de cellules différentes à l'égard de l'expression de la PKC α et ce, de façon tout à fait indépendante de l'expression des constructions. Pour pouvoir conclure de l'effet des constructions il aurait fallu:

- 1) Transfecter la construction témoin (ECV/pcDNA3) ainsi que les constructions sens et antisens à partir de cellules possédant le même nombre de passages, évaluer le nombre de clones de chaque population et comparer des populations où la quantité de clones est la même. La génération de lignées clonales et l'analyse de plusieurs clones différents auraient également été possible.

- 2) Réaliser une étude Northern pour s'assurer de l'expression de l'ARN exogène
- 3) Réaliser les études Western à partir de transfectants possédant le même nombre de passages
- 4) Mesurer l'activité PKC totale de chaque transfectants afin de s'assurer que la modification d'immunoréactivité observée est corrélée par une modification de l'activité.

D'autre part, il est impossible d'associer les phénotypes étudiés (expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 et l'état des fibres de stress) à l'expression de la PKC α puisque les modifications observées pourraient très bien être dues à des modifications aléatoires entre les différentes populations et non à des différences d'expression de la PKC α .

4.5 Expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 chez les transfectants ECV/PKC α et ECV/CKP α

Quelques études ont montré un rôle de la PKC dans l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 par les cellules endothéliales (Sung et coll., 1994; Deisher et coll., 1993). Nous voulions déterminer si l'isoforme α de la PKC était impliqué dans la régulation de ces molécules d'adhésion par des essais d'antisens et de surexpression. Cependant, tel que discuté à la section précédente, il est impossible d'utiliser les résultats obtenus avec les transfectants ECV/PKC α et ECV/CKP α , dû aux erreurs méthodologiques effectuées. Ces expériences semblent tout de même indiquées que les cellules ECV 304 expriment de façon constitutive la molécule d'adhésion ICAM-1 et que les PKCc et PKCn ne semblent pas impliquées dans la régulation de son

expression puisqu'aucune modification des niveaux de ICAM-1 n'est observée suite au traitement par le PMA. En ce qui a trait à VCAM-1, les résultats montrent que cette molécule d'adhésion n'est pas exprimée de façon constitutive et qu'un ou des isoformes faisant partie des PKCc et/ou PKCn en régulent l'expression puisqu'une augmentation du niveau de VCAM-1 est observée suite au traitement par le PMA.

4.6 Étude de la morphologie des microfilaments chez les cellules ECV 304

Tel que montré à la figure 7a, les filaments d'actine se présentent chez les cellules ECV 304 sous la forme de fibres de stress qui parcourent la cellule de façon transversale. La régulation négative de la PKC par traitement au PMA a permis de confirmer que la PKC est impliquée dans le maintien des fibres de stress (figure 7e). Le mécanisme par lequel la PKC peut réguler l'assemblage et/ou le maintien de l'intégrité des filaments d'actine n'est pas clair. Il semble cependant que Rho, une protéine ayant une activité GTPasique, y joue un rôle important. Des études réalisées avec les cellules Swiss 3T3 ont montré que l'inactivation de Rho amène une perte des fibres de stress (Ridley et Hall, 1992). Ces fibres peuvent être rapidement récupérées par microinjection de Rho activé (Ridley et Hall, 1992). Le lien entre Rho et la PKC implique possiblement les lipides kinases PI-3K et PIP-5K qui sont activés par l'addition de Rho à des extraits cellulaires (Zhang et coll., 1993; Chong et coll., 1994). La PI-3K catalyse, à partir de PI-4,5-P₂, la formation de PI-3,4,5-P₃ qui est un activateur des isoformes ϵ et ζ de la PKC (Toker et coll., 1994; Nakanishi et coll., 1993). De son côté, la PIP-5K phosphoryle le PIP pour former du PI-4,5-P₂, qui sous l'action de la phospholipase C génère du DAG et du Ca²⁺ (via la production d'IP₃), deux activateurs de plusieurs isoformes de la PKC (Nishizuka, 1992). La

disparition des fibres de stress observée par le traitement au PMA se fait possiblement par un effet sur cette voie de signalisation.

Tel que montré aux figures 7b et 7c, la morphologie des filaments d'actine n'est pas modifiée chez les cellules ECV/pcDNA3, ni chez les transfectants ECV/PKC α . Par contre, les transfectants ECV/CKP α sont caractérisés par une absence de fibres de stress (Figure 7d). Les cellules utilisées ont été sélectionnées pour la résistance au G418 et non pour la diminution d'expression de la PKC α . Par conséquent, nous devons être en présence d'une population de cellules hétérogènes à l'égard de la quantité de PKC α exprimée et nous devrions s'attendre à ce que l'aspect des fibres de stress soit également hétérogène dans la population ECV/CKP α . Cependant, le phénotype est homogène dans la population. Ceci indique clairement que l'absence de fibres de stress dans la population ECV/CKP α n'est pas due à une diminution d'expression de l'isoforme α de la PKC mais qu'il s'agit plutôt d'un effet de sélection de populations différentes dû au fait que les transfections (des cellules contrôles et des cellules pour la diminution d'expression) ont été effectuées à partir de cellules possédant des nombres de passages différents.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier les Drs. Gilles Dupuis et Marcel D. Payet de m'avoir permis d'effectuer ma maîtrise au sein de leur équipe.

J'adresse mes remerciements au Dr Charaf Anhadi pour l'immense aide apportée dans la réalisation des études sur le cytosquelette et de cytofluorimétrie.

Je tiens à remercier Julie Martel pour son aide technique en biologie moléculaire, sa bonne humeur communicative et les nombreux lunches partagés.

J'adresse mes remerciements au FCAR, à l'Université de Sherbrooke et à la Faculté de Médecine pour l'aide financière apportée.

Gros merci à Isa pour la correction de l'orthographe et de la syntaxe.

Finalement, je tiens à remercier ma famille et Isa pour le support et l'encouragement reçu lors des moments plus difficiles de ces deux dernières années.

RÉFÉRENCES

- Akimoto, K., Mizuno, K., Osada, S., Hirai, S., Tanuma, S., Suzuki, K., et Ohno, S. (1994). A new member of the third class in the protein kinase C family, PKC lambda, expressed dominantly in an undifferentiated mouse embryonal carcinoma cell line and also in many tissues and cells. *Journal of Biological Chemistry* 269, 12677-12683.
- Alon, R., Kassner, P.D., Carr, M.W., Finger, E.B., Hemler, M.E., et Springer, T.A. (1995). The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *Journal of Cell Biology* 128, 1243-1253.
- Arnaout, M.A. (1990). Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 75, 1037-1050.
- Asako, H., Wolf, R.E., Granger, D.N., et Korthuis, R.J. (1992). Phalloidin prevents leukocyte emigration induced by proinflammatory stimuli in rat mesentery. *American Journal of Physiology* 263, H1637-H1642.
- Bacher, N., Zisman, Y., Berent, E., et Livneh, E. (1991). Isolation and characterization of PKC-L, a new member of the protein kinase C-related gene family specifically expressed in lung, skin, and heart. *Molecular & Cellular Biology* 11, 126-133.
- Baier, G., Telford, D., Giampa, L., Coggeshall, K.M., Baier-Bitterlich, G., Isakov, N., et Altman, A. (1993). Molecular cloning and characterization of PKC theta, a novel member of the protein kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells. *Journal of Biological Chemistry* 268, 4997-5004.
- Bell, R.M., et Burns, D.J. (1991). Lipid activation of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 266, 4661-4664.
- Bevilacqua, M.P. (1993). Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annual Review of Immunology* 11, 767-804.
- Birge, R.B., Fajardo, J.E., Reichman, C., Shoelson, S.E., Songyang, Z., Cantley, L.C., et Hanafusa, H. (1993). Identification and characterization of a high-affinity interaction between v-Crk and tyrosine-phosphorylated paxillin in CT10-transformed fibroblasts. *Molecular & Cellular Biology* 13, 4648-4656.
- Boller, K., Vestweber, D., et Kemler, R. (1985). Cell-adhesion molecule uvomorulin is localized in the intermediate junctions of adult intestinal epithelial cells. *Journal of Cell Biology* 100, 327-332.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Butcher, E.C. (1991). Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67, 1033-1036.
- Carlos, T.M., et Harlan, J.M. (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84, 2068-2101.

- Carpenter, D., Jackson, T., et Hanley, M.R. (1987). Protein kinase Cs. Coping with a growing family. *Nature* 325, 107-108.
- Chen, H.C., et Guan, J.L. (1994). Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10148-10152.
- Chong, L.D., Traynor-Kaplan, A., Bokoch, G.M., et Schwartz, M.A. (1994). The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* 79, 507-513.
- Clark, E.A., et Brugge, J.S. (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268, 233-239.
- de Fougerolles, A.R., Stacker, S.A., Schwarting, R., et Springer, T.A. (1991). Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *Journal of Experimental Medicine* 174, 253-267.
- Deisher, T.A., Haddix, T.L., Montgomery, K.F., Pohlman, T.H., Kaushansky, K., et Harlan, J.M. (1993). The role of protein kinase C in the induction of VCAM-1 expression on human umbilical vein endothelial cells. *FEBS Letters* 331, 285-290.
- Dekker, L.V., et Parker, P.J. (1994). Protein kinase C--a question of specificity. *Trends in Biochemical Sciences* 19, 73-77.
- Doukas, J., Shepro, D., et Hechtman, H.B. (1987). Vasoactive amines directly modify endothelial cells to affect polymorphonuclear leukocyte diapedesis in vitro. *Blood* 69, 1563-1569.
- Dustin, M.L., et Springer, T.A. (1989). T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 341, 619-624.
- Edelman, G.M. (1992). Mediation and inhibition of cell adhesion by morphoregulatory molecules. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 57, 317-325.
- Foxall, C., Watson, S.R., Dowbenko, D., Fennie, C., Lasky, L.A., Kiso, M., Hasegawa, A., Asa, D., et Brandley, B.K. (1992). The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide. *Journal of Cell Biology* 117, 895-902.
- Fujimori, T., Miyatani, S., et Takeichi, M. (1990). Ectopic expression of N-cadherin perturbs histogenesis in *Xenopus* embryos. *Development* 110, 97-104.
- Fuortes, M., Jin, W.W., et Nathan, C. (1994). Beta 2 integrin-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin in human neutrophils treated with tumor necrosis factor. *Journal of Cell Biology* 127, 1477-1483.
- Ginsberg, M.H., Du, X., et Plow, E.F. (1992). Inside-out integrin signalling. *Current Opinion in Cell Biology* 4, 766-771.

- Green, P.J., Tamatani, T., Watanabe, T., Miyasaka, M., Hasegawa, A., Kiso, M., Yuen, C.T., Stoll, M.S., et Feizi, T. (1992). High affinity binding of the leucocyte adhesion molecule L-selectin to 3'-sulphated-Le(a) and -Le(x) oligosaccharides and the predominance of sulphate in this interaction demonstrated by binding studies with a series of lipid-linked oligosaccharides. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 188, 244-251.
- Grunwald, G.B. (1993). The structural and functional analysis of cadherin calcium-dependent cell adhesion molecules. *Current Opinion in Cell Biology* 5, 797-805.
- Hardingham, T.E., et Fosang, A.J. (1992). Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB Journal* 6, 861-870.
- Hogg, N. (1991). An integrin overview. *Chemical Immunology* 50, 1-12.
- Hogg, N., Harvey, J., Cabanas, C., et Landis, R.C. (1993). Control of leukocyte integrin activation. *American Review of Respiratory Disease* 148, S55-S59.
- House, C., Wettenhall, R.E., et Kemp, B.E. (1987). The influence of basic residues on the substrate specificity of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 262, 772-777.
- Hynes, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.
- Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y., et Nishizuka, Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *Journal of Biological Chemistry* 252, 7610-7616.
- Ishii, H., Jirousek, M.R., Koya, D., Takagi, C., Xia, P., Clermont, A., Bursell, S.E., Kern, T.S., Ballas, L.M., Heath, W.F., Stramm, L.E., Feener, E.P., et King, G.L. (1996). Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* 272, 728-731.
- Johannes, F.J., Prestle, J., Eis, S., Oberhagemann, P., et Pfizenmaier, K. (1994). PKC ϵ is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *Journal of Biological Chemistry* 269, 6140-6148.
- Jutila, M.A. (1994). Function and regulation of leukocyte homing receptors. *Journal of Leukocyte Biology* 55, 133-140.
- Kintner, C. (1992). Regulation of embryonic cell adhesion by the cadherin cytoplasmic domain. *Cell* 69, 225-236.
- Koide, H., Ogita, K., Kikkawa, U., et Nishizuka, Y. (1992). Isolation and characterization of the epsilon subspecies of protein kinase C from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 1149-1153.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Leibersperger, H., Gschwendt, M., et Marks, F. (1990). Purification and characterization of a calcium-unresponsive, phorbol ester/phospholipid-activated protein kinase from porcine spleen. *Journal of Biological Chemistry* 265, 16108-16115.
- Ley, K., Tedder, T.F., et Kansas, G.S. (1993). L-selectin can mediate leukocyte rolling in untreated mesenteric venules in vivo independent of E- or P-selectin. *Blood* 82, 1632-1638.
- Liao, L., Hyatt, S.L., Chapline, C., et Jaken, S. (1994). Protein kinase C domains involved in interactions with other proteins. *Biochemistry* 33, 1229-1233.
- Liyanage, M., Frith, D., Livneh, E., et Stabel, S. (1992). Protein kinase C group B members PKC-delta, -epsilon, -zeta and PKC-L(eta). Comparison of properties of recombinant proteins in vitro and in vivo. *Biochemical Journal* 283, 781-787.
- Mattila, P., Majuri, M.L., Tiisala, S., et Renkonen, R. (1994). Expression of six protein kinase C isotypes in endothelial cells. *Life Sciences* 55, 1253-1260.
- Miyasaka, M. (1995). Cancer metastasis and adhesion molecules. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 10-18.
- Murray, J.A.H. et Crockett, N. (1992). Antisense Techniques: An Overview. Antisense RNA and DNA. J.A.H. Murray, ed. (New York: Wiley-Liss), pp. 1-49.
- Murray, N.R., Burns, D.J., et Fields, A.P. (1994). Presence of a beta II protein kinase C-selective nuclear membrane activation factor in human leukemia cells. *Journal of Biological Chemistry* 269, 21385-21390.
- Nagafuchi, A., et Takeichi, M. (1988). Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *EMBO Journal* 7, 3679-3684.
- Nakajima, H., Sano, H., Nishimura, T., Yoshida, S., et Iwamoto, I. (1994). Role of vascular cell adhesion molecule 1/very late activation antigen 4 and intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function-associated antigen 1 interactions in antigen-induced eosinophil and T cell recruitment into the tissue. *Journal of Experimental Medicine* 179, 1145-1154.
- Nakanishi, H., Brewer, K.A., et Exton, J.H. (1993). Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *Journal of Biological Chemistry* 268, 13-16.
- Nishizuka, Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334, 661-665.
- Nishizuka, Y. (1989). The Albert Lasker Medical Awards. The family of protein kinase C for signal transduction. *JAMA* 262, 1826-1833.
- Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258, 607-614.

Ono, Y., Fujii, T., Igarashi, K., Kuno, T., Tanaka, C., Kikkawa, U., et Nishizuka, Y. (1989a). Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 4868-4871.

Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K., et Nishizuka, Y. (1989b). Protein kinase C zeta subspecies from rat brain: its structure, expression, and properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 3099-3103.

Osada, S., Mizuno, K., Saido, T.C., Akita, Y., Suzuki, K., Kuroki, T., et Ohno, S. (1990). A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC ϵ , a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *Journal of Biological Chemistry* 265, 22434-22440.

Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi-Rosso, G., et Lobb, R. (1989). Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 59, 1203-1211.

Parker, P.J., Kour, G., Marais, R.M., Mitchell, F., Pears, C., Schaap, D., Stabel, S., et Webster, C. (1989). Protein kinase C--a family affair. *Molecular & Cellular Endocrinology* 65, 1-11.

Paterson, I.S., Klausner, J.M., Goldman, G., Welbourn, R., Alexander, J.S., Shepro, D., et Hechtman, H.B. (1989). The endothelial cell cytoskeleton modulates extravascular polymorphonuclear leukocyte accumulations in vivo. *Microvascular Research* 38, 49-56.

Pears, C.J., Kour, G., House, C., Kemp, B.E., et Parker, P.J. (1990). Mutagenesis of the pseudosubstrate site of protein kinase C leads to activation. *European Journal of Biochemistry* 194, 89-94.

Rice, G.E., et Bevilacqua, M.P. (1989). An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science* 246, 1303-1306.

Richardson, A., et Parsons, J.T. (1995). Signal transduction through integrins: a central role for focal adhesion kinase? *Bioessays* 17, 229-236.

Ridley, A.J., et Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399.

Roark, E.F., Paradies, N.E., Lagunowich, L.A., et Grunwald, G.B. (1992). Evidence for endogenous proteases, mRNA level and insulin as multiple mechanisms of N-cadherin down-regulation during retinal development. *Development* 114, 973-984.

Rothlein, R., Czajkowski, M., O'Neill, M.M., Marlin, S.D., Mainolfi, E., et Merluzzi, V.J. (1988). Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies. *Journal of Immunology* 141, 1665-1669.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schaller, M.D., Hildebrand, J.D., Shannon, J.D., Fox, J.W., Vines, R.R., et Parsons, J.T. (1994). Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Molecular & Cellular Biology* 14, 1680-1688.
- Schaller, M.D., et Parsons, J.T. (1994). Focal adhesion kinase and associated proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 6, 705-710.
- Selbie, L.A., Schmitz-Peiffer, C., Sheng, Y., et Biden, T.J. (1993). Molecular cloning and characterization of PKC iota, an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. *Journal of Biological Chemistry* 268, 24296-24302.
- Shattil, S.J., Ginsberg, M.H., et Brugge, J.S. (1994). Adhesive signaling in platelets. *Current Opinion in Cell Biology* 6, 695-704.
- Sligh, J.E., Jr., Ballantyne, C.M., Rich, S.S., Hawkins, H.K., Smith, C.W., Bradley, A., et Beaudet, A.L. (1993). Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 8529-8533.
- Springer, T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314.
- Stamenkovic, I., Aruffo, A., Amiot, M., et Seed, B. (1991). The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *EMBO Journal* 10, 343-348.
- Stossel, T.P. (1993). On the crawling of animal cells. *Science* 260, 1086-1094.
- Sung, C.P., Arleth, A.J., et Nambi, P. (1994). Evidence for involvement of protein kinase C in expression of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) by human vascular endothelial cells. *Pharmacology* 48, 143-146.
- Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M., et Nishizuka, Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *Journal of Biological Chemistry* 252, 7603-7609.
- Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T., et Nishizuka, Y. (1979a). Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *Journal of Biological Chemistry* 254, 3692-3695.
- Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T., et Nishizuka, Y. (1979b). Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 91, 1218-1224.
- Takeichi, M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251, 1451-1455.

- Tanaka, Y., Adams, D.H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U., et Shaw, S. (1993). T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* 361, 79-82.
- Toker, A., Meyer, M., Reddy, K.K., Falck, J.R., Aneja, R., Aneja, S., Parra, A., Burns, D.J., Ballas, L.M., et Cantley, L.C. (1994). Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3. *Journal of Biological Chemistry* 269, 32358-32367.
- Uchiyama, H., et Anderson, K.C. (1994). Cellular adhesion molecules. *Transfusion Medicine Reviews* 8, 84-95.
- von Andrian, U.H., Chambers, J.D., McEvoy, L.M., Bargatze, R.F., Arfors, K.E., et Butcher, E.C. (1991). Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 7538-7542.
- Watson, S.R., Fennie, C., et Lasky, L.A. (1991). Neutrophil influx into an inflammatory site inhibited by a soluble homing receptor-IgG chimera. *Nature* 349, 164-167.
- Yamada, K.M., et Miyamoto, S. (1995). Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Current Opinion in Cell Biology* 7, 681-689.
- Zhang, J., King, W.G., Dillon, S., Hall, A., Feig, L., et Rittenhouse, S.E. (1993). Activation of platelet phosphatidylinositide 3-kinase requires the small GTP-binding protein Rho. *Journal of Biological Chemistry* 268, 22251-22254.